

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos



TESIS DOCTORAL

Desarrollo de metodología para estimar la calidad del músculo de merluza (*Merluccius merluccius* L.) conservado en estado congelado. Aplicación de la relaxometría ^1H RMN de bajo campo

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Javier Sánchez Valencia

Directores

Mercedes Careche Recacoechea
Isabel Sánchez Alonso

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**Departamento de Nutrición, Bromatología y
Tecnología de los Alimentos**



**DESARROLLO DE METODOLOGÍA PARA ESTIMAR
LA CALIDAD DEL MÚSCULO DE MERLUZA
(*Merluccius merluccius* L.) CONSERVADO EN
ESTADO CONGELADO. APLICACIÓN DE LA
RELAXOMETRÍA ¹H RMN DE BAJO CAMPO**

TESIS DOCTORAL

JAVIER SÁNCHEZ VALENCIA

DIRECTORES

Mercedes Careche Recacoechea

Isabel Sánchez Alonso

Madrid, 2015



Madrid, 19 de octubre de 2015

Doña Mercedes Careche Recacoechea, Dra. en Ciencias Químicas por la Universidad Autónoma de Madrid, Profesora de Investigación de Consejo Superior de Investigaciones Científicas, adscrita al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN), dentro del Departamento de Productos,

Doña Isabel Sánchez Alonso, Dra. por la Universidad Complutense de Madrid, adscrita al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición, dentro del Departamento de Productos,

Hacen constar:

Que la presente memoria titulada “Desarrollo de metodología para estimar la calidad de músculo de merluza (*Merluccius merluccius* L.) conservado en estado congelado. Aplicación de la relaxometría ^1H RMN de bajo campo” presentada por Don Javier Sánchez Valencia para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el ICTAN bajo su dirección, y que, hallándose concluida, autorizan su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Dra. Mercedes Careche Recacoechea

Dra. Isabel Sánchez Alonso

SEDE CIUDAD UNIVERSITARIA:

C/ JOSÉ ANTONIO NOVÁIS, 10
CIUDAD UNIVERSITARIA
28040 MADRID, ESPAÑA
TELS.: 91 544 56 07 – 91 549 23 00
FAX: 91 549 36 27

SEDE JUAN DE LA CIERVA:

C/JUAN DE LA CIERVA, 3
28006 MADRID, ESPAÑA
TELS.: 91 562 29 00
FAX: 91 564 48 53



ER-0366/2008
ALCANCE: La gestión y ejecución de proyectos y contratos de investigación en el área de ciencia y tecnología de alimentos y nutrición.



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a una beca de Formación de Personal Investigador (FPI) referencia BES-2008-007283 otorgada a D. Javier Sánchez Valencia dentro del programa de formación de personal investigador de la convocatoria de 2008.

El trabajo de Tesis ha sido realizado dentro del proyecto “Desarrollo de metodología para el control de la historia térmica de merluza congelada por espectroscopía vibracional” Investigador principal: Mercedes Careche. Octubre 2007-Diciembre 2010. MEC. AGL2007 – 65661.

SEDE CIUDAD UNIVERSITARIA:

C/ JOSÉ ANTONIO NOVÁIS, 10
CIUDAD UNIVERSITARIA
28040 MADRID, ESPAÑA
TELS.: 91 544 56 07 – 91 549 23 00
FAX: 91 549 36 27

SEDE JUAN DE LA CIERVA:

C/JUAN DE LA CIERVA, 3
28006 MADRID, ESPAÑA
TELS.: 91 562 29 00
FAX: 91 564 48 53



ER-0366/2008
ALCANCE: La gestión y ejecución de proyectos y contratos de investigación en el área de ciencia y tecnología de alimentos y nutrición.

**A mi abuela,
María del Carmen
Muñoz Arias**

**Las estrellas en el cielo
son solo migas de pan
que nos dejan nuestros sueños
para encontrar
el camino, y no perdernos
hacia la Tierra de Oz,
donde habita la ilusión.**

**Y verás que tú puedes volar
y que todo lo consigues.
Y verás que no existe el dolor,
hoy te toca ser feliz.**

**Y verás que tú puedes volar,
y que tu cuerpo es el viento,
porque hoy tú vas a sonreír,
hoy te toca ser feliz.**

Jesús María Hernández Gil

AGRADECIMIENTOS

En los inicios de esta aventura, alguien me dijo que realizar una Tesis era como participar en una carrera de fondo. Después de todo lo vivido yo matizaría un poco más: es como participar en una carrera de fondo con obstáculos que a veces son sumamente difíciles de sortear. Es entonces cuando vienen las dudas y el desánimo hasta tal punto que incluso piensas en tirar la toalla porque no te ves capaz de seguir adelante. Sin embargo, en ese momento siempre he tenido a alguien a mi alrededor que me ha tendido la mano y ha tirado de mí para poder librar ese obstáculo que tanto me costaba sobrepasar. Agradezco a todas esas personas que habéis creído y apostado por mí porque gracias a vosotros he llegado a la meta.

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directores de Tesis, la profesora de investigación Mercedes Careche Recacoechea y a la doctora Isabel Sánchez Alonso. Gracias por brindarme esta oportunidad, por transmitirme tantos conocimientos, por la dedicación que me habéis prestado y por enseñarme todo lo necesario a nivel científico para que esta Tesis haya salido adelante.

También quisiera agradecer especialmente a Pilar Moreno sus aportaciones técnicas. Tú me enseñaste a dar los primeros pasos en el laboratorio, gracias por tu ayuda incondicional y tu disponibilidad en todo momento.

A todos los que trabajan o han trabajado en el ICTAN, porque en los cuatro años que he estado en el instituto seguro que he necesitado algo de todos y cada uno de vosotros y siempre lo he obtenido muy fácilmente.

A mis compañeros de trabajo Efrén, Tomás, Tati, Ailén, Begoña, María Hidalgo, Helena Moreno, Mari Luz, Raquel, Inés, Mehdí, Gonzalo, Ruth, Marta, Beatriz Herranz, Beatriz Sólo, Nuria Blanco, Fabiola Olivares, María Blanch, Raquel Rosales, Yoyes, Oscar Martínez, Mauri, Fernando Díaz, Cristina de las Heras, Carmen de la Mata, Kike...espero no dejarme a nadie. Gracias por compartir conmigo tantos momentos buenos, malos y regulares, sea como fuese siempre podía contar con todos vosotros.

A mis amigos del “HS Club”: Moisés, José Luis, José Jesús, Félix, Gemma, Mónica y Fátima; a mis amigos del “Mastodont’s Club”: Eva, Miguel, Carlos y Noe; y a mis amigos de “la Uni”: Paco y Miguel. Gracias a todos por estar siempre pendientes, por preguntarme y por vuestro apoyo. Cuando las cosas no iban bien estar con vosotros era una grandísima terapia.

Gracias a la familia Vicario, mi nueva familia, (suegros, cuñados, y sobrinos), sois increíbles. Gracias por estar conmigo siempre, vuestro apoyo y vuestros consejos han sido indispensables para llegar al final.

Mari José, por supuesto no puedo olvidarme de ti, lo que hemos pasado juntos: alegrías, tristezas, enfados, desenfados. Aunque siempre lo veíamos muy lejano, al final la Tesis ha llegado a su fin y sin lugar a dudas tú también has colaborado para lograrlo. Gracias por estar a mi lado en todo momento. Gracias por apoyarme y ayudarme en todo lo que he necesitado y cuando lo he necesitado. Siento si en ocasiones no he hecho las cosas como tú esperabas, has tenido una gran paciencia conmigo y has sabido esperar para ver cumplido este objetivo tan importante en mi vida. Gracias por todo.

Muy especialmente, quería agradecer a mi abuela María del Carmen. Tú me has enseñado a luchar por lo que quieres y por los que quieres. A lo largo de mi vida no he conocido a nadie que haya luchado más que tú en la injusta vida que te tocó vivir y sólo te rendiste cuando ya no te quedaron ni fuerzas ni lágrimas para seguir adelante. Gracias por estar a mi lado porque aunque te hayas ido, te siento y te sentiré siempre muy cerca de mí, dándome fuerzas, mimos y consuelo cuando sea necesario.

Finalmente quiero agradecer a mis padres Félix y René. ¿Os lo creéis?, parecía que este momento no iba a llegar nunca, pero al final ha llegado, la Tesis es una realidad. Os tengo que dar las gracias por tantas cosas: gracias por apoyarme, gracias por aconsejarme, gracias por escucharme, gracias por entenderme, gracias por valorarme, gracias por enseñarme, gracias por consolarme y gracias por darme unos estudios que han sido pilares fundamentales de lo que soy hoy y seré el día de mañana.

ÍNDICE

RESUMEN/SUMMARY	1
1.- INTRODUCCIÓN	13
1.1.- ASPECTOS GENERALES.....	15
1.1.1.- Merluza.....	18
1.1.2.- Estructura y composición del músculo de pescado.....	20
1.1.3.- Cambios <i>post mortem</i>	30
1.2.- ALTERACIONES DURANTE LA CONGELACIÓN Y CONSERVACIÓN DE PESCADO EN ESTADO CONGELADO.....	33
1.2.1.- Alteraciones sensoriales.....	33
1.2.2.- Cambios en las propiedades tecnofuncionales y textura instrumental.....	33
1.2.3.- Modificaciones en la ultraestructura.....	35
1.2.4.- Cambios en los componentes musculares.....	36
1.3.- APLICACIONES DE LA RELAXOMETRÍA ¹ H RMN DE BAJO CAMPO EN MIOSISTEMAS.....	39
1.3.1.- Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).....	39
1.3.2.- Utilización de la relaxometría ¹ H RMN de bajo campo en miosistemas sujetos a diferentes situaciones tecnológicas.....	54
1.3.3.- Relación entre los cambios observables por relaxometría ¹ H RMN de bajo campo y otros métodos físico-químicos.....	60
1.4.- DESARROLLO DE MODELOS PARA EVALUAR CAMBIOS EN LA CALIDAD DEL PESCADO CONGELADO Y/O ESTIMAR SU VIDA ÚTIL.....	63
2.- JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	69
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	79
3.1.- DISEÑO EXPERIMENTAL, MATERIA PRIMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	81
3.1.1.- Optimización de las condiciones de ensayo en relaxometría ¹ H RMN de bajo campo.....	81
3.1.2.- Experimento con merluza conservada a -10 °C.....	83
3.1.3.- Experimento con merluza conservada a -10, -20, -30 y -80 °C.....	86
3.2.-ANÁLISIS ELEMENTALES Y pH.....	90
3.3.-ANÁLISIS PERIÓDICOS.....	92
3.3.1.- Capacidad de retención de agua (CRA).....	92
3.3.2.- Viscosidad aparente.....	92
3.3.3.- Resistencia a la cizalladura.....	93
3.3.4.- Perfil de ésteres metílicos de ácidos grasos por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (FID).....	95
3.3.5.- Relaxometría ¹ H RMN de bajo campo.....	97
3.4.- ANÁLISIS DE DATOS.....	99
3.4.1.- Análisis de la relaxometría ¹ H RMN de bajo campo.....	99
3.4.2.- Análisis estadístico.....	102
3.4.3.- Modelización cinética.....	103

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	109
4.1.- EFECTO DE LAS CONDICIONES DE ANÁLISIS EN LA RELAXOMETRÍA ¹H RMN DE BAJO CAMPO	111
4.1.1.- Efecto de la temperatura y tiempo durante la preparación de la muestra	111
4.1.2.- Efecto de la temperatura y tiempo durante el proceso de descongelación	123
4.1.3.- Efecto del día de análisis	127
4.1.4.- Efecto del tiempo de preparación prolongado y de las características de conservación de la muestra	129
4.2.- EVOLUCION DE LOS PARÁMETROS OBTENIDOS MEDIANTE RELAXOMETRÍA ¹H RMN DE BAJO CAMPO Y DE LOS PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS EN MERLUZA CONSERVADA A -10 °C	131
4.2.1.- Análisis elementales y pH	131
4.2.2.- Parámetros físico-químicos	132
4.2.3.- Parámetros de relaxometría ¹ H RMN de bajo campo	135
4.2.4.- Relación de la relaxometría ¹ H RMN de bajo campo, con los parámetros físico-químicos	143
4.2.5.- Análisis de regresión entre los parámetros de relaxometría y el tiempo de conservación a -10 °C	148
4.3.- EVOLUCIÓN DE LA RESISTENCIA A LA CIZALLADURA Y CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA EN MERLUZA CONSERVADA EN CONGELACIÓN A -10, -20, -30 y -80 °C. OBTENCIÓN DE MODELOS CINÉTICOS	155
4.3.1.- Análisis elementales y pH	155
4.3.2.- Evolución de resistencia a la cizalladura y capacidad de retención de agua	157
4.3.3.- Modelización cinética de la resistencia a la cizalladura	158
4.3.4.- Modelización cinética de la capacidad de retención de agua	162
4.3.5.- Predicción del tiempo y de la temperatura de conservación	167
4.4.- PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS EN MÚSCULO DE MERLUZA CONSERVADA EN CONGELACIÓN A -10, -20, -30 y -80 °C. OBTENCIÓN DE MODELOS CINÉTICOS	173
4.4.1.- Perfil de ácidos grasos en merluza sin congelar	173
4.4.2.- Modificaciones durante la conservación en estado congelado	175
4.4.3.- Modelización cinética de los ácidos grasos libres	190
4.5.- EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS OBTENIDOS MEDIANTE RELAXOMETRÍA ¹H RMN DE BAJO CAMPO EN MERLUZA CONSERVADA A -10, -20, -30, Y -80 °C. OBTENCIÓN DE MODELOS CINÉTICOS	197
4.5.1.- Análisis elementales y pH	197
4.5.2.- Evolución de los parámetros de relaxometría ¹ H RMN de bajo campo	197
4.5.3.- Análisis por componentes principales	206
4.5.4.- Modelización cinética de los parámetros de la relaxometría	211
5.- CONCLUSIONES	227
6.- BIBLIOGRAFÍA	231
7.- ANEXO	249

RESUMEN/SUMMARY

Introducción

La calidad de un alimento se puede estimar en base a unos indicadores que pueden ser cuantificados mediante diferentes métodos analíticos y que suelen ser específicos para cada producto. Es deseable que los indicadores utilizados se obtengan por métodos instrumentales rápidos, no destructivos y no invasivos. La espectroscopía permite idealmente de forma no destructiva o sin tratamiento previo del producto determinar varias propiedades o compuestos simultáneamente y monitorizar sus cambios en función de los tratamientos tecnológicos al que éste ha sido sometido. Una de estas espectroscopías es la Resonancia Magnética Nuclear del protón (^1H RMN) de bajo campo.

Los productos de la pesca son muy perecederos por lo que es necesario aplicar frío inmediatamente para evitar su deterioro y la conservación en estado congelado es un método muy efectivo para prolongar su vida útil, ya que disminuye la velocidad de muchos procesos físico-químicos y paraliza el crecimiento microbiano. Sin embargo en función del método de congelación utilizado, el tiempo y temperatura de conservación, la especie, el procesado previo a la congelación, etc., pueden ocurrir diferentes alteraciones en el producto que se traduzcan en una pérdida de calidad pudiendo llegar al fin de su periodo de vida comercial o al rechazo por parte del consumidor.

Hipótesis y objetivos

Teniendo en cuenta: a) la importancia que tiene el agua y las proteínas musculares en los cambios estructurales, físico-químicos y sensoriales asociados a la pérdida de calidad de pescado congelado, b) que los compuestos musculares y su organización estructural pueden verse afectados por diferentes condiciones de congelación y conservación, c) que los tiempos de relajación transversal (T_2) de la relaxometría ^1H RMN de bajo campo pueden dar información sobre la naturaleza físico-química y estructural de los compuestos musculares, el objetivo general de esta Tesis fue explorar las posibilidades de la relaxometría ^1H RMN de bajo campo para proporcionar indicadores que, en su caso, pudieran utilizarse como herramienta para estimar la calidad y/o vida útil del producto. Se seleccionó merluza (*Merluccius merluccius* L.) por su alto valor comercial y por ser un buen modelo para el estudio del deterioro que sufren los pescados magros.

Este objetivo general requirió la consecución de varios objetivos parciales. El primero fue optimizar el método de relaxometría para las condiciones de congelación estudiadas. En segundo lugar, para estimar la calidad y/o vida útil del producto, inicialmente se requería estudiar su evolución en el tiempo a una temperatura fija y en una segunda fase, a varias temperaturas y tiempos. En tercer lugar, se precisaba comparar esta evolución con marcadores físico-químicos cuyo uso estuviera bien establecido para esta especie conservada en estado congelado de tal forma que los resultados de relaxometría se pudieran correlacionar con estos métodos directamente o bien establecer una comparación entre ellos a través de sus correspondientes modelos

cinéticos. Esta modelización cinética no se encontró en la literatura en el caso de los marcadores utilizados habitualmente para este fin, por lo que fue necesaria no sólo para el caso de la relaxometría sino también para los otros marcadores físico-químicos.

Material y métodos

El estudio se planteó en diferentes fases, de tal forma que se realizaron tres grupos de experimentos: optimización de las condiciones de preparación de la muestra, estudio de conservación a una temperatura y estudio a varias temperaturas y tiempos. Además del análisis de relaxometría, los principales métodos físico-químicos utilizados fueron la capacidad de retención de agua, resistencia a la cizalladura con la célula de Kramer, viscosidad aparente e hidrólisis de lípidos. En el análisis de datos se utilizaron técnicas quimiométricas y fundamentalmente, la modelización cinética.

Resultados y discusión

Los resultados indicaron que las condiciones del análisis mediante relaxometría ^1H RMN de bajo campo en el músculo de merluza descongelado, requieren temperaturas de preparación de la muestra entre 2 y 6 °C. Se observó la importancia de la descongelación completa de la muestra, pero una vez que ésta alcanzaba la temperatura de análisis, no se observaron modificaciones en la señal de relaxometría al menos hasta 5 horas tras la preparación. Los parámetros fueron bastante estables en diferentes días de análisis y no se observó interacción entre las condiciones de preparación y la calidad de la muestra.

Los cambios en los parámetros de relaxometría ^1H RMN de bajo campo que se observaron a lo largo de la conservación de merluza (*Merluccius merluccius* L.) en congelación tanto en el experimento donde se fijó una temperatura como en el que se estudiaron distintos tiempos y temperaturas, se consideran provocados por las modificaciones en los movimientos rotacionales y difusivos del agua muscular así como por la presencia de intercambios químicos entre sus protones y entre los protones de otros biopolímeros, fundamentalmente proteínas del músculo. Estos cambios se consideran relacionados con las modificaciones que sufre el músculo a consecuencia de la congelación y conservación en el estado congelado.

Tras estimar que la evolución de los parámetros espectroscópicos fue dependiente del tiempo y que existieron correlaciones con los parámetros físico-químicos, se observó una dependencia de la velocidad de modificación de estos parámetros con la temperatura, lo que permitió modelizar cinéticamente el comportamiento, tanto de los parámetros espectroscópicos como de los físico químicos, obteniendo varios modelos con energías de activación semejantes y de máxima utilidad en el rango de las temperaturas usadas a nivel comercial.

Conclusión

La dependencia de los parámetros de relaxometría con la temperatura y con el tiempo de conservación observados en este trabajo ha permitido su modelización cinética y sugiere el uso de la ^1H RMN de bajo campo en la estimación de la calidad de los productos pesqueros en relación con su historia térmica, a temperaturas de conservación donde el riesgo de que el producto pueda sufrir un deterioro es más

acentuado. El hecho de que estos modelos posean energías de activación semejantes a los realizados con parámetros físico-químicos puede reforzar la relaxometría como herramienta alternativa o complementaria para estudios de calidad y/o estimación de la vida útil de la merluza conservada en congelación.

Introduction

Food quality can be estimated based on indicators that can be quantified by different analytical methods that are usually specific to each product. It is desirable that these indicators are obtained by rapid, non-destructive and non-invasive instrumental methods. Ideally, spectroscopy allows non-destructively or without pretreatment of the product to determine various properties or compounds simultaneously and to monitor changes in food products occurring due to technological treatments given to the food. One of these spectroscopies is low field nuclear magnetic resonance of proton (^1H NMR).

Fishery products are highly perishable, so it is necessary to apply low temperatures immediately to prevent deterioration. Frozen storage is a very effective method to prolong shelf life, as it decreases the rate of many physical and chemical processes and paralyzes microbial growth. However depending on the freezing method used, time and storage temperatures, the species, type of processing prior to freezing, etc., changes in the product can occur, that result in a loss of quality, and the product may reach the end of their shelf life or be rejected by consumers.

Hypothesis and objectives

Bearing in mind: a) the importance of water and muscle proteins in the structural, physical-chemical and sensory changes associated with quality loss in frozen fish, b) that muscle compounds and their structural organization may be affected by different freezing and frozen storage conditions, c) that transverse relaxation times (T_2)

from low field ^1H NMR relaxometry can provide information on the physico-chemical and structural nature of muscular compounds, the overall objective of this Thesis was to explore the possibilities of low field ^1H NMR relaxometry to provide indicators, that could be used as a tool to estimate the quality and/or shelf life of the fish product. Hake (*Merluccius merluccius* L.) was selected due their high commercial value and for being a good model for studying the deterioration suffered by lean fish during frozen storage.

This general objective was divided into several partial objectives. The first was to optimize the preparation of samples for relaxometry according to the freezing conditions studied. Secondly, in order to estimate the fish muscle quality and/or shelf life, it was initially required to monitor the evolution in time of the LF NMR parameters at a fixed temperature and in a second phase, at various temperatures and times. Thirdly, it was needed to compare this evolution with other physico-chemical markers whose use was well established for the study of this species preserved in the frozen state, so that the results of relaxometry could correlate with these methods directly or else, a comparison between them through their corresponding kinetic models could be established. This kinetic modeling was not found in the literature for these markers, so it was necessary to develop the models not only for the case of relaxometry, but also to other physical-chemical parameters.

Material and methods

The study was conducted in different phases, so that three groups of experiments were performed: optimization of the conditions of sample preparation, storage study at a given temperature, and storage study at several temperatures. Besides relaxometry

analysis, the main physico-chemical methods used in this Thesis were water holding capacity, shear resistance measured with the Kramer cell, apparent viscosity and hydrolysis of lipids. Data analysis was performed by chemometrics, but mainly kinetic modeling was used.

Results and discussion

The results indicated that the conditions of analysis by low field ^1H NMR relaxometry in thawed hake muscle, require sample preparation temperatures between 2 and 6 °C. The importance of a thorough thawing of the sample was stressed, but once the temperature of analysis was reached, no additional changes were observed in the signal at least up to 5 hours after sample preparation. The values were quite stable on different days of analysis and no interaction between the preparation conditions and sample quality was observed.

Changes in low field ^1H NMR relaxometry parameters were observed along storage of hake (*Merluccius merluccius* L.) in both, the experiment where freezing temperature was fixed, and also in the one where different times and temperatures were studied. They are considered to be caused by changes in rotational and diffusive movements of muscle water and by chemical exchange between water protons and protons from biopolymers, mainly muscle proteins. These changes are considered linked to those experienced by the muscle due to the freezing and frozen storage.

After estimating that the evolution of the spectroscopic parameters was dependent on time and that there were correlations with other physicochemical

parameters, a dependency of the rate of change of these parameters with temperature was observed, which allowed to kinetically modeling the behavior of both spectroscopic and physicochemical parameters, obtaining several models with similar activation energies and which were most useful in the range of commercially used temperatures.

Conclusion

The dependence of relaxometry parameters with temperature and time observed in this study, has been allowed to kinetically model them and it suggests the use of low field ^1H NMR in the estimation of the quality of fishery products in relation to their thermal history, at storage temperatures where the risk that the product may deteriorate is more accentuated. The fact that these models have activation energies similar to other physicochemical parameters can reinforce relaxometry as a alternative or complementary tool to the ones used for this species.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- ASPECTOS GENERALES

El pescado constituye una de las mejores fuentes de proteínas, vitaminas, minerales y compuestos nitrogenados no proteicos de nuestro abanico alimentario. Además este producto posee la más importante fuente de ácidos grasos poliinsaturados que incorporados en la vida diaria favorecen una dieta sana y cardiosaludable (Ros et al. 2010). España, junto con Noruega, Portugal y Francia, lidera el consumo de pescado en Europa, aunque en 2014 éste bajó en nuestro país un 4 % con respecto al año 2013, debido probablemente a la situación económica vivida (MAGRAMA, 2015).

Así, el pescado constituye un componente esencial en la dieta y se ha desarrollado una potente industria para atender estas necesidades nutricionales, resultado de lo cual existe una gran variedad de productos que abarcan desde pescado entero a picado, producto prácticamente sin elaborar, únicamente refrigerado o conservado en estado congelado, o alimentos con una muy amplia gama de formas de procesado, desde enlatados, ahumados, secado, gelificados, etc.

Es un producto muy perecedero por lo que hay que aplicar lo antes posible tecnologías que disminuyan la velocidad de los procesos degradativos y minimicen el deterioro. La congelación constituye el principal método de conservación de pescado cuando se pretende mantener durante tiempos prolongados. Por ejemplo, a nivel mundial en 2010 un 29,3 % del pescado destinado al consumo humano se comercializó congelado (FAO, 2012). Además, un porcentaje muy alto del pescado que se elabora ha sido mantenido previamente en estado congelado. Datos recogidos por la FAO muestran que del 14 % del pescado sometido a transformación (pescado elaborado o en conserva),

el 55,2 % fue comercializado congelado (FAO, 2012). En la actualidad, con objeto de asegurar la muerte de larvas de parásitos presentes en los productos pesqueros, la congelación es obligatoria para operadores de alimentos que pongan en el mercado productos de la pesca, en caso de que el producto se consuma crudo o poco cocinado o para productos sometidos a tratamientos como marinado, salado, etc. que sean insuficientes para matar los parásitos (EC 1276/2011).

El éxito de este método de conservación es indiscutible y sin embargo pueden ocurrir alteraciones que lleven consigo al deterioro del producto e incluso al fin de su vida comercial. El tipo y velocidad de las modificaciones que ocurren en producto congelado dependen de un gran número de factores que pueden clasificarse como a) intrínsecos, que incluye especies, estado nutricional o época de captura, entre otros b) asociados al tipo de muerte del pez (artes de pesca, tipo de sacrificio, etc), c) relacionados con el manejo y conservación *post mortem*, d) asociados a la integridad del músculo y a cualquier tipo de procesamiento previo a la congelación, y e) relativos a las condiciones de congelación y conservación, entre las que destacan la velocidad de congelación, temperatura y tiempo de conservación. Estos factores pueden en cierta medida controlarse con el uso por ejemplo, de barreras protectoras físicas, la adición de crioprotectores, o el mantenimiento de bajas temperaturas durante la conservación (Carmona et al. 2010).

La variedad de productos pesqueros, así como el rango de especies y tipos de procesado, dan lugar a una gama muy amplia de alimentos comercializados y de posibilidades para nuevas presentaciones, pero también una fuente de potenciales problemas a los que hay que dar respuesta. Por ejemplo, la apertura a los mercados

internacionales y de las áreas de captura, el gran número de especies comercializadas y las diferencias entre calidad y precio en los distintos mercados, permiten la intervención de elementos oportunistas y la falsificación de la documentación que debe de acompañar a los alimentos pesqueros (Martínez & Jacobsen Friis, 2004). Este fraude perjudica directamente al consumidor y, en casos extremos, puede incidir sobre el consumo genérico de pescado, pudiendo llevar al declive de todo un sector agroalimentario. Por otro lado, las empresas necesitan diferenciar sus productos de la competencia y algunas introducen certificaciones de calidad adicionales. Estas son algunas de las razones de las que surge la necesidad de desarrollar métodos de análisis para estimar las modificaciones de los productos pesqueros que a su vez puedan relacionarse con la calidad o con aspectos de procesado como la historia térmica. El sector pesquero ha puesto de manifiesto el interés por instrumentación y metodología en pescado congelado para estos fines (Jorgensen et al. 2003).

La elucidación de los cambios que originan los procesos de conservación en el estado congelado es lenta, requiriendo años de experimentación para su consecución, limitando el número y variedad de herramientas existentes en comparación con las utilizadas para el análisis de determinadas propiedades en pescado fresco y además, la mayoría de los procedimientos disponibles son destructivos y laboriosos. Los métodos espectroscópicos ofrecen, idealmente de forma no destructiva o sin tratamiento previo de las muestras, la posibilidad de crear una huella dactilar de las propiedades del pescado y determinar varias propiedades o compuestos del material analizado simultáneamente. Algunas técnicas espectroscópicas han sido analizadas con diferente grado de éxito con estos fines.

En esta introducción se abordan aspectos generales relacionados con las características del pescado y el efecto de la congelación y conservación en estado congelado, el uso de la relaxometría ^1H RMN de bajo campo en distintas situaciones tecnológicas, así como el desarrollo de métodos para evaluar cambios durante la conservación en estado congelado.

1.1.1.- Merluza

El género *Merluccius* pertenece a la familia merlucciidae y son vertebrados marinos teleósteos del orden de los gadiformes (Lloris et al. 2003) en el que se agrupan hasta 16 especies diferentes que reciben el nombre genérico de merluza y que incluyen a especies demersales muy explotadas (Lloris et al. 2003), con una alta demanda en el mercado español. De hecho, España constituye el principal mercado mundial de merluza, con unas importaciones en el año 2013 de 124.161 t (MAGRAMA, 2014). Es el pescado fresco más consumido en España de tal forma que en el año 2014 supuso un 21,37 % del consumo de pescado de esta categoría (Martín, 2015). En el año 2013 el consumo de merluza fue de 3,66 kg por persona de los cuales 1,03 kg correspondieron a merluza congelada (MAGRAMA, 2014), mientras que en 2014 el consumo total disminuyó ligeramente (3,5 kg por persona), pero la proporción de merluza congelada consumida incrementó ligeramente (28,1 y 28,6 kg/persona en 2013 y 2014 respectivamente) (Martín, 2015).

La tabla 1.1 refleja las especies de merluza con mayor valor comercial. En España, *Merluccius merluccius* es la más consumida por su proximidad a nuestras costas y por sus características sensoriales. Galicia es la primera productora española de

Merluccius merluccius (70 %), seguida del País Vasco (9 %) y de una manera mucho más reducida el Mediterráneo (MARM, 2011).

Tabla 1.1: Tabla-resumen de las especies más comercializadas *Merluccius* spp. Datos extraídos de Lloris et al. (2003)

NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE COMERCIAL	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA
<i>Merluccius merluccius</i>	Merluza europea	Costas de Gran Bretaña, y del Noroeste y del Norte de la Península Ibérica, mar Negro, Mar Mediterráneo
<i>Merluccius bilinearis</i>	Merluza americana o plateada	Costas atlánticas de Canadá y de Estados Unidos
<i>Merluccius productus</i>	Merluza del Pacífico	Pacífico Oriental: Canadá Estados Unidos y Golfo de California y México
<i>Merluccius gayi</i>	Merluza del Perú o Gayi	Pacífico suramericano entre Perú y Chile
<i>Merluccius australis</i>	Merluza Austral o merluza de Chile o merluza sureña	Costas de Nueva Zelanda, Chile y Argentina
<i>Merluccius capensis</i> <i>Merluccius paradoxus</i>	Merluza del Cabo Merluza del Cabo o merluza de altura	Atlántico suroriental, costa de Namibia
<i>Merluccius hubbsi</i>	Merluza argentina o sudamericana	Atlántico suroccidental, al sur y al este de las costas argentinas
<i>Merluccius senegalensis</i>	Merluza negra o merluza del Senegal	Atlántico oriental desde las costas de Marruecos hasta Cabo Blanco

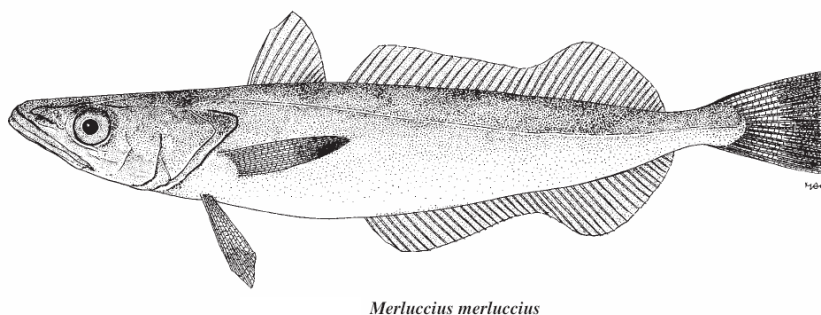


Figura 1.1: Dibujo de la especie *Merluccius merluccius* Lloris et al. (2003)

1.1.2.- Estructura y composición del músculo de pescado

Estructura.- La estructura del músculo de los peces difiere de la del resto de los animales vertebrados ya que carece del sistema tendinoso que conecta los paquetes musculares al esqueleto del animal. Este tipo de musculatura permite a los peces adquirir la flexibilidad suficiente para propulsarse a través del agua (FAO, 1998). En general las fibras del músculo de pescado son más cortas que las de los mamíferos y aves. Estos músculos están compuestos por paquetes de fibras denominados miotomos que se disponen en forma de “W” (figura 1.2 a), separados entre sí por envolturas de tejido conectivo que se denominan mioseptos (figura 1.2 b) y se disponen de manera oblicua formando un patrón de surcos perpendiculares al eje longitudinal del pez, desde la piel hasta la espina (Belitz et al. 2009; FAO, 1998).

En general, en los animales vertebrados cada músculo esquelético (figura 1.3 a) está rodeado por una vaina de tejido conectivo denso llamado epimisio. De esta vaina parten tabiques hacia el interior del músculo que reciben el nombre perimisio. En el

interior de estas fascias se encuentran agrupados haces de células musculares denominadas fibras. Las fibras musculares (figura 1.3 b) son cilíndricas, alargadas y multinucleares y están separadas una de otra por un tipo de tejido conectivo denominado endomisio. Poseen una membrana plasmática denominada sarcolema y contienen en su interior haces de fibras paralelas denominadas miofibrillas, que están rodeadas por el retículo sarcoplásmico y bañadas por el sarcoplasma (Paniagua et al. 1998).

A su vez cada miofibrilla (figura 1.3 b) está compuesta por filamentos gruesos, constituidos por miosina y filamentos delgados, compuestos fundamentalmente por actina, así como por tropomiosina y troponinas. Los miofilamentos forman el sarcómero que es la unidad estructural y funcional del músculo estriado (Paniagua et al. 1998). En la ultraestructura de un sarcómero (figura 1.3 b) se distinguen la banda I (isótropa, clara) que corresponde a sectores constituidos sólo por filamentos de actina, la banda A (anisótropa, oscura) correspondiente a una zona de superposición de filamentos de actina y miosina y la zona H, que es una zona constituida sólo por filamentos de miosina. Las miofibrillas están divididas longitudinalmente por los discos Z. La extensión del sarcómero quedará delimitada entre dos discos Z (Paniagua et al. 1998).

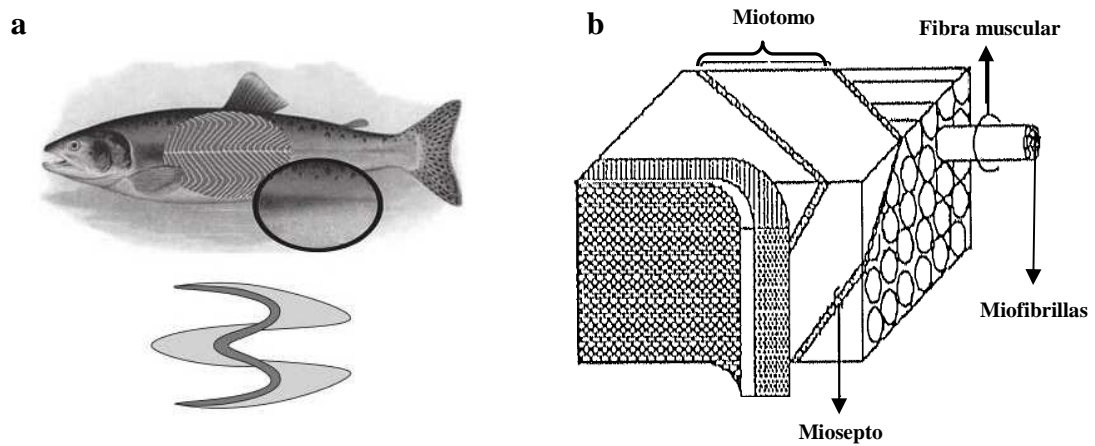


Figura 1.2: Estructura del músculo esquelético de pescado. La figura a) muestran la forma en W de los miotomos (Tahergorabi, 2011) y la figura b) muestra en detalle la estructura muscular en pescado (Suzuki, 1987)

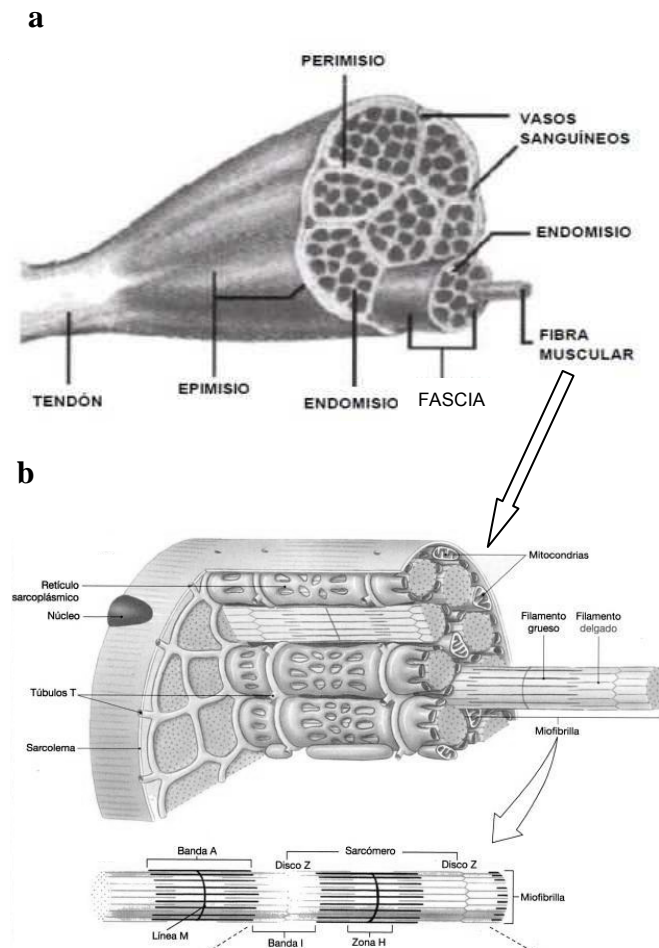


Figura 1.3: Estructura del músculo de vertebrados: a) visión general (Renou et al. 2003) y b) organización de la fibra muscular (Silverthorn, 2008)

Dependiendo de la cantidad de mioglobina, los músculos se clasifican en rojo y blanco (figura 1.4). El músculo rojo es el encargado de la natación sostenida mientras que el músculo blanco realiza los movimientos rápidos. El primero se encuentra justo debajo de la piel y debajo de la línea lateral, dejando el resto de espacios para el músculo blanco (Belitz et al. 2009; Murray & Burt, 2001). Los peces que habitan en los fondos marinos tienen relativamente poca proporción de músculo rojo, mientras que los que están nadando continuamente tienen una alta proporción de este tipo de músculo, llegando a poseer en torno al 50 % del peso total del mismo. El músculo rojo, está muy irrigado y no sólo es rico en mioglobina, sino también en lípidos, ácidos nucleicos y vitaminas hidro y liposolubles. El músculo blanco por el contrario, está menos irrigado, posee menos cantidad de vitaminas y menor proporción de lípidos que son en su mayoría estructurales (Belitz, 2009; FAO, 1998).

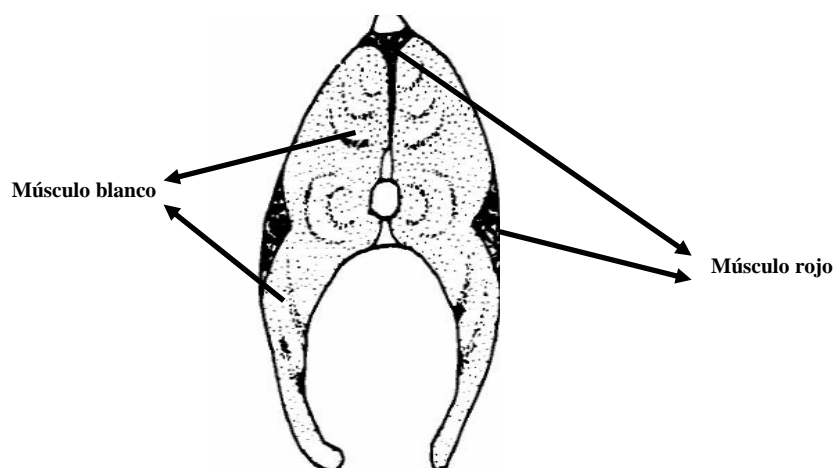


Figura 1.4: Localización de los dos tipos de músculo estriado en pescado (FAO, 1998)

Composición.- El agua, las proteínas y los lípidos son los componentes más abundantes en el músculo de pescado (FAO, 1998). El agua es el componente mayoritario con porcentajes entre el 60 y 80 %. El porcentaje en proteínas oscila en torno al 16 y el 21 % y los lípidos están en una proporción entre el 0,2 y el 25 % (Love, 1970; Stansby, 1962).

Los compuestos minoritarios en el músculo de pescado incluyen los minerales, las vitaminas, los carbohidratos y los compuestos nitrogenados no proteicos (FAO, 1998).

La composición química de los peces puede variar entre las diferentes especies y también entre individuos de una misma especie. La variabilidad puede depender a su vez de factores como edad, sexo, medio ambiente o estación del año (FAO, 1998). En particular la especie *Merluccius merluccius* contiene un 80 % de agua, 18 % de proteínas, 1 % de grasa y 1 % de cenizas (Careche & Tejada, 1990).

Agua.- En general el porcentaje de agua muscular es bastante constante. Muchas de las propiedades sensoriales del músculo como textura, firmeza, o jugosidad dependen del estado del agua muscular y en ocasiones durante el procesado y conservación pueden producirse pérdidas de agua por exudación que repercutirán en la apreciación sensorial del producto (Bello, 2010).

Como ya se ha visto previamente, el músculo es un tejido altamente estructurado y el agua se tiene que adecuar al espacio que queda libre en este tejido. Puede estar localizada entre las cadenas polipeptídicas de una misma proteína, entre las proteínas miofibrilares, entre las miofibrillas, entre las fibras y entre las fascias (Offer & Knight, 1988). En el *agua intracelular*, la mayor parte del agua intramiofibrilar está **atrapada** entre los espacios que dejan entre sí las miofibrillas por efectos estéricos de atracción (Hull-Lonergan & Lonergan, 2005; Pearce et al. 2011), y por lo general cambia a estado sólido a temperaturas de congelación y puede ser usada como disolvente (Fennema, 1996; Hull-Lonergan & Lonergan, 2005). Una pequeña parte del agua intramiofibrilar está **unida** a las proteínas miofibrilares (Fennema, 1996; Hull-Lonergan & Lonergan,

2005; Pearce et al. 2011) y tiene unas propiedades muy diferentes al agua volumétrica ya que es resistente a la congelación (Fennema, 1996; Hull-Lonergan & Lonergan, 2005). El agua intermiofibrilar ocupa por fuerzas débiles de capilaridad los espacios entre las miofibrillas (Hamm, 1986; Pearce et al. 2011) y es donde se encuentran disueltas las proteínas sarcoplásmicas y distintos iones presentes en el músculo (Paniagua et al. 1998). El *agua extracelular* ocupa también, por fuerzas capilares, los espacios existentes entre las fibras y el endomisio y entre las fascias y el perimisio (Offer & Knight, 1988; Pearce et al. 2011). En el músculo en vivo, la gran mayoría del agua es intracelular y no más del 10 % corresponde a agua extracelular (Offer & Knight, 1988), pero cuando el animal muere, este porcentaje puede cambiar debido a todos los procesos físico-químicos que ocurren hasta que el músculo se convierte en carne (Offer & Knight, 1988). Las distintas uniones o asociaciones del agua muscular pueden verse modificadas con el procesado y la conservación. Así las moléculas de agua de los distintos compartimentos una vez libres pueden desplazarse por distintas zonas del músculo hasta en ocasiones salir fuera del alimento (Fennema, 1996; Hull-Lonergan & Lonergan, 2005; Pearce et al. 2011; Offer & Knight, 1988).

Proteínas.- El pescado es considerado un alimento de alto valor proteico ya que sus proteínas al igual que las de la leche, huevo y carne de los mamíferos contienen todos los aminoácidos esenciales para el ser humano (Murray & Burt, 2001). Las proteínas musculares se clasifican habitualmente en sarcoplásmicas, miofibrilares y del estroma y presentan distinta solubilidad (Belitz et al. 2009; Herrera et al. 2003). De este modo, las proteínas sarcoplásmicas son solubles en agua y en disoluciones salinas de baja fuerza iónica ($\mu=0,05-0,15$). Las proteínas miofibrilares sólo se solubilizan en disoluciones salinas de alta fuerza iónica ($\mu>0,5$) y las del estroma son insolubles en estas

condiciones (Belitz et al. 2009; Herrera et al. 2003).

Las *proteínas sarcoplásmicas* están localizadas en el citoplasma muscular y constituyen del 25 al 30 % del total de proteína presente en el músculo (Belitz et al. 2009). En este grupo de proteínas se incluyen enzimas, albúminas y pigmentos (mioglobina) (Belitz et al. 2009; FAO, 1998). Las *proteínas miofibrilares* constituyen del 65 al 70 % de las proteínas del músculo, y están formadas por miosina, actina, tropomiosina, troponinas y por otras proteínas del citoesqueleto que contribuyen a la estabilización del sarcómero (Belitz et al. 2009; Torrejón, 1996). La miosina es un hexámero que tiene un peso muscular aproximado de 530 kDa y está compuesta por 2 cadenas pesadas y 4 cadenas ligeras. Las dos cadenas pesadas están enrolladas entre si en forma de α -hélice con la parte final replegada de tal forma que cada cadena pesada forma una cabeza globular en la que se asocian las cadenas ligeras y dan a la molécula forma de bastón (Paniagua et al. 1998). Las moléculas de miosina se ordenan formando los filamentos gruesos observándose las cabezas hacia afuera de la molécula. Cada filamento grueso está constituido por la agrupación de entre 200 y 400 moléculas de miosina (Belitz et al. 2009; Paniagua, et al. 1998). En las cabezas de la miosina reside la actividad ATPasa necesaria para la contracción muscular (Belitz et al. 2009; Paniagua et al. 1998). La actina globular o G actina es un monómero con un peso molecular entre 41 y 42,3 kDa y la propiedad de ligar ATP. En presencia de cationes simples o doblemente cargados la G actina inicia la polimerización a actina fribilar o F actina formando una doble cadena enrollada helicoidalmente donde se produce la hidrólisis de ATP a ADP (Belitz et al. 2009; Paniagua et al. 1998). Las fibras de actina junto con fibrillas de tropomiosina y con la troponina, constituyen los filamentos delgados de la fibra muscular (Belitz et al. 2009; Paniagua et al. 1998). Las proteínas

estructurales miosina y actina son las responsables de la contracción muscular y la tropomiosina y las troponinas son las encargadas de regular este proceso (Belitz et al. 2009; Herrera et al. 2003; Paniagua et al. 1998). La estructura de los filamentos gruesos y de los filamentos delgados se puede observar en la figura 1.5. Las *proteínas del estroma* son las presentes en el tejido conectivo y están en menor proporción en el músculo de pescado que en el músculo de mamíferos, constituyendo aproximadamente el 3 % del total de proteínas en peces teleósteos y el 10 % en elasmobranquios, mientras que este porcentaje sube al 17 % en mamíferos. Sus principales componentes son colágeno y elastina (Belitz et al. 2009). La temperatura de retracción del colágeno del pescado es bastante inferior a la del colágeno de los mamíferos (Belitz et al. 2009).

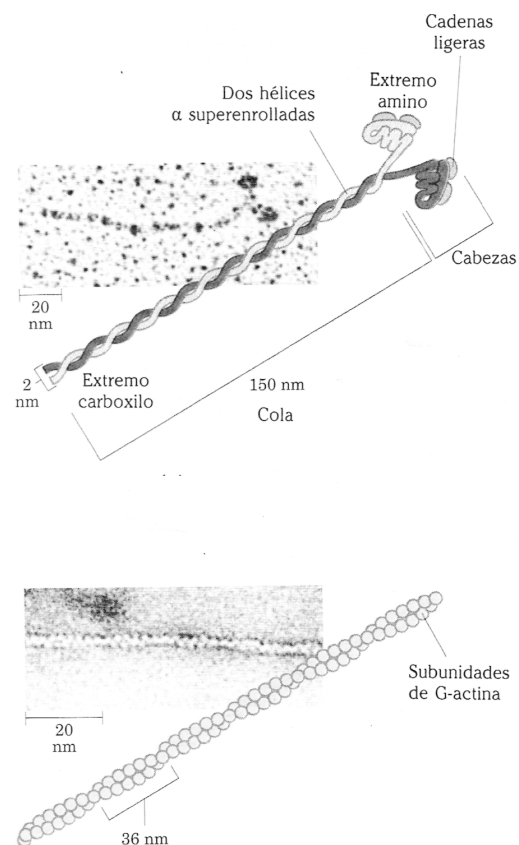


Figura 1.5: Estructura de los filamentos delgados y los filamentos gruesos (Lehninger et al. 1995)

Lípidos.- La cantidad de lípidos contenida en los peces es muy variable, estando sometida a grandes oscilaciones ya que no sólo depende de la especie, sino también del ciclo de maduración sexual, de la época del desove, de la disponibilidad de alimentos y de los hábitos alimenticios (Belitz et al. 2009). Según su contenido lipídico las diferentes especies de pescado se agrupan en magras, como la merluza que habitualmente suelen tener un 1% de materia grasa pero que agrupa a especies con hasta un 2,5 % de materia grasa, semigrasas, cuyo contenido está entre 2,5 y 6 %, como por ejemplo el jurel y en especies grasas, con más de un 6 %, como es el caso del salmón (Ros et al. 2010).

Los lípidos presentes en las especies de peces teleósteos se pueden clasificar en fosfolípidos y triglicéridos (FAO, 1998). En músculo de pescado, todos los *fosfolípidos* tienen una función estructural y se encuentran formando parte de diferentes membranas como la membrana plasmática, y membranas de organulos como las mitocondrias o el retículo sarcoplásmico (FAO, 1998). Los *triglicéridos* son lípidos de reserva y en las especies grasas están localizados en el tejido subcutáneo, en los músculos del vientre y en los músculos que mueven las aletas y la cola (FAO, 1998). En las especies magras estos compuestos están localizados cerca de los mioseptos y en las regiones entre el músculo blanco y el rojo donde la concentración de células grasas es más elevada (FAO, 1998). El músculo blanco de un pez magro típico como la merluza, que contiene menos del 1 % de lípidos, el 10% corresponde a triglicéridos y los fosfolípidos constituyen el 90 % (FAO, 1998).

Los lípidos de los peces a diferencia de lo que ocurre en mamíferos, están compuestos por ácidos grasos de cadena larga (14-22 átomos de carbono) con un alto

grado de insaturación (Ros et al. 2010). Los ácidos grasos de la familia n-3, comúnmente denominados omega-3 (dobles enlaces ubicados a partir del tercer átomo de carbono, si se empieza a contar por el grupo metilo) son muy abundantes en el pescado. De éstos los más comunes son el ácido eicosanopentanóico (EPA) y el ácido docosahexanóico (DHA) (FAO, 1998). Estos compuestos se consideran esenciales para el organismo pues no pueden ser sintetizados (Ros et al. 2010). Se considera que si en la ingesta se añaden de 0,5 a 1,8 gramos diarios de EPA y de DHA se reduce el riesgo de sufrir problemas cardiacos. Los beneficios cardiosaludables de los ácidos omega-3 junto con el hecho de que el pescado es la principal fuente de estos ácidos grasos, hacen que el consumo de pescado sea muy recomendable en la dieta.

Constituyentes minoritarios del pescado.- Los peces marinos son ricos en iodo y selenio aunque también contienen calcio, fósforo, magnesio, hierro, cobre y sodio (Belitz et al. 2009; FAO, 1998). En general, el músculo de pescado es una buena fuente de vitamina B y en el caso de las especies grasas, también de vitaminas A, D, E y K (Belitz et al. 2009; FAO, 1998). Los carbohidratos en pescado son escasos ($\leq 0,3$ %) con baja cantidad de glucógeno en comparación con el músculo de los mamíferos (Belitz et al. 2009). Los compuestos nitrogenados no proteicos constituyen en los peces teleósteos entre un 9 y un 18 % del nitrógeno total (FAO, 1998). Así, el óxido de trimetilamina (OTMA) constituye en peso seco del 1 al 5 % del tejido muscular en peces marinos (FAO, 1998). Este compuesto tiene un papel fisiológico muy importante, ejerciendo funciones similares al de la urea o el ácido úrico en los mamíferos para mantener el balance de nitrógeno. La creatinina es un compuesto nitrogenado no proteico muy abundante (600 y 700 mg/kg de músculo fresco) con una función energética en los procesos de contracción muscular (Belitz et al. 2009; FAO, 1998). Los aminoácidos

libres están en una proporción de entre 300 y 700 mg por cada 100 g de músculo y su cantidad y tipo varía con la especie (FAO, 1998), siendo los más predominantes histidina, taurina, alanina, glicina, anserina o carnosina (Belitz et al. 2009; FAO, 1998). Entre los nucleótidos destacan el ATP, el AMP, ADP y el IMP con papeles muy relevantes en la contracción muscular y en los cambios *post mortem* en el músculo de pescado (Belitz et al. 2009; FAO, 1998). El contenido en bases nitrogenadas púricas en el músculo de pescado es de 300 mg/kg y la más relevante es la hipoxantina proveniente de la degradación del ATP (Belitz et al. 2009; FAO, 1998).

1.1.3.- Cambios *post mortem*

Tras la muerte del pez, éste sufre una serie de cambios autolíticos y otros relacionados con un aumento de la proliferación bacteriana que pueden afectar a la estructura muscular y/o provocar su deterioro.

Justo después de la muerte del pez el músculo está totalmente relajado y la textura es flexible y elástica. Posteriormente el músculo se contrae y se vuelve duro y rígido entrando en estado de *rigor mortis*. Esta condición generalmente se mantiene durante uno o más días y luego se resuelve. La resolución del *rigor mortis* hace que el músculo se relaje nuevamente y recupere la flexibilidad, pero no la elasticidad previa al *rigor*. La proporción entre el comienzo y la resolución del *rigor* varía según la especie y es afectada por la temperatura, manipulación, tamaño y condiciones físicas del pescado (FAO, 1998).

Procesos autolíticos en los constituyentes del pescado.- Tras la muerte del pez se detiene la circulación sanguínea, y por tanto no llega oxígeno al músculo. Sin embargo se consume energía para mantener la temperatura y la integridad estructural de sus células. Así el músculo empieza a ver mermadas las reservas de ATP mientras que simultáneamente se incrementan los niveles de ADP y Fosfato. La fosfocreatina proporciona la energía suficiente para incrementar los niveles de ATP, hasta que ésta se consume y comienza a utilizarse una ruta alternativa catalizada por la adenilato quinasa o mioquinasa, que produce ATP a partir de dos moléculas de ADP obteniendo ATP y AMP (Martinez, 1997). Se produce la degradación de glucógeno a glucosa utilizando las reservas de oxígeno debido a los altos niveles de AMP, que activan la enzima fosforilasa b. Cuando no hay suficiente oxígeno para el metabolismo aerobio, se produce la glucólisis anaerobia para producir ATP, incrementando los niveles de ácido láctico y disminuyendo el pH (FAO, 1998; Martinez, 1997). Llega un momento en el que la cantidad de ATP no es suficiente para mantener en reposo el potencial de membrana y el secuestro de los iones libres de Ca^{2+} entre las células musculares (Martinez, 1997) lo cual tiene múltiples efectos a nivel intracelular. En particular, los iones Ca^{2+} se unirán a la troponina C y permitirán la existencia de interacción entre la actina y la miosina de tal forma que el músculo se contrae produciendo el estado de *rigor mortis* (Martinez, 1997). El aumento de Ca^{2+} también provocará la activación de diferentes hidrolasas, se unirá a membranas, interaccionará directamente con el disco Z y provocará la solubilización de proteínas contráctiles (Martinez, 1997). Además los bajos niveles de pH citosólico favorecen la actividad de las proteasas y se producirá una degradación de estructuras que terminarán provocando cambios en la ultraestructura y en definitiva un ablandamiento de los tejidos (FAO, 1998).

Proliferación de microorganismos bacterianos.- La bajada del pH y del porcentaje de azúcares y el aumento del contenido en nitrógeno no proteico facilitarán el crecimiento bacteriano (Leroi, 2010). En la superficie de la piel, las bacterias colonizan una amplia extensión de la base de las escamas. Las bacterias más importantes en el deterioro del pescado son psicrotrofas (crecimiento posible a 0 °C y óptimo alrededor de 25 °C) gram negativas como *pseudomonas* spp., *Shewanella putrefaciens*, *Photobacterium phosphoreum* y muchas bacterias de la familia de las vibrionaceae (Leroi, 2010). Todas ellas producen en su metabolismo grandes cantidades de trimetilamina (TMA) (Adams & Moss, 1997; FAO, 1998). La TMA es un compuesto que es muy característico en el deterioro del pescado ya que producirá olores y sabores desagradables (Adams & Moss, 1997; FAO, 1998). Este compuesto se forma a partir del óxido de trimetilamina (OTMA) que mediante la OTMA reductasa, reduce el OTMA a TMA (Adams & Moss, 1997; FAO, 1998). En particular *S. putrefaciens* es una bacteria que además de TMA produce compuestos sulfurados volátiles provenientes de la desaminación de aminoácidos sulfurados como la metionina y la cisteína. Estos compuestos también producen olores desagradables (Adams & Moss, 1997).

1.2.- ALTERACIONES DURANTE LA CONGELACIÓN Y CONSERVACIÓN DE PESCADO EN ESTADO CONGELADO

La congelación es uno de los métodos más eficaces para preservar el pescado durante tiempos prolongados ya que paraliza la actividad microbiana y reduce la velocidad de la mayor parte de las reacciones químicas. En función del método de congelación utilizado, el tiempo y temperatura de conservación, la especie o el procesado previo a la congelación pueden ocurrir diferentes alteraciones en el producto que se traducen en una disminución de su calidad sensorial que van acompañadas con cambios a nivel funcional, ultraestructural y en la composición del músculo.

1.2.1.- Alteraciones sensoriales

En especies magras, fundamentalmente pueden producirse cambios en textura que harán del músculo un producto duro, seco y fibroso mientras que las especies grasas se deterioran por la aparición de rancidez oxidativa dando lugar a olores y sabores desagradables, aunque también pueden producirse este tipo de cambios en especies magras.

1.2.2.- Cambios en las propiedades tecnofuncionales y textura instrumental

Las propiedades tecnofuncionales de las proteínas se pueden definir como aquellas propiedades físicas y químicas que derivan del comportamiento de proteínas en sistemas alimenticios durante el procesado, almacenamiento, preparación y consumo. En general puede considerarse como cualquier propiedad fisicoquímica que afecta y

modifica las características de los alimentos contribuyendo a su calidad final. Con la congelación cuando los tiempos de conservación son prolongados, las proteínas musculares son gradualmente inextraíbles en disoluciones salinas (Tejada, et al. 1996; Careche et al. 2002a; Del Mazo et al. 1999). La viscosidad aparente de homogeneizados proteicos es, junto con la extractabilidad en disoluciones salinas, una de las propiedades funcionales más utilizada para determinar cambios de las proteínas musculares de pescado conservado en congelación (Barroso et al. 1998a). Estas propiedades funcionales decrecen a diferentes velocidades dependiendo de factores como la estacionalidad, especie o temperatura de congelación (Careche & Tejada, 1990; Careche et al. 2002a).

Las dos propiedades citadas anteriormente requieren de la extracción de las proteínas miofibrilares, aunque existen otras como la capacidad de retención de agua (CRA) que no dependen de ésta. La CRA es una de las propiedades más importantes en cualquier tipo de músculo. En los miosistemas se define como la habilidad del músculo de mantener el agua tras aplicar una fuerza (Offer & Knight, 1988). Las hipótesis clásicas por las que se produce la retención de agua en músculo están basadas en fuerzas electrostáticas o fuerzas osmóticas que causan el hinchamiento de las miofibrillas. Más recientemente se ha atribuido adicionalmente a efectos relacionados con la estructura del agua, de baja o alta densidad, inducida la primera por efectos kosmotrópicos dominantes en el sistema y por efectos kaotrópicos en el segundo caso (Puolanne & Jalonon, 2010). Se ha comprobado en numerosos trabajos que la CRA disminuye durante la conservación en congelación al menos a altas temperaturas de congelación (p.e. Burgaard & Jørgensen, 2010; Herrero et al. 2005; Schubring, 2004).

Los atributos de textura instrumental cambian de forma significativa en función del tipo de procesado y tiempo y temperatura de conservación en estado congelado, de tal forma que parámetros como la resistencia a la cizalladura o dureza incrementan en distintas especies de pescado en función de estos factores y en general están bien correlacionados con la textura percibida sensorialmente (Barroso et al. 1998a). Estos parámetros se consideran test empíricos o imitativos que tienen su correlato en la percepción de textura medida por análisis sensorial. Son métodos en los que no están completamente definidas las propiedades reológicas y mecánicas del producto pero que se utilizan ya que en muchos casos el análisis sensorial de textura es difícil de realizar por motivos de tiempo y coste (Szczeniak, 1987).

1.2.3.- Modificaciones en la ultraestructura

Durante la conservación en congelación ocurren cambios en la morfología de las fibras musculares. Así en músculo de especies magras se han observado cambios en las fibras musculares, de tal forma que durante largos periodos a altas temperaturas de congelación éstas se compactan y muchas se rompen y tienen formas irregulares (Herrero et al. 2005). Se puede producir una gradual compresión del retículo sarcoplásmico (Shenouda, 1980; Howgate, 1979; García et al. 1999; Herrero et al. 2005) con una consiguiente reducción del espacio intermiofibrilar. También se ha observado una deformación en la ordenación hexagonal de los miofilamentos llevando a una reducción del espacio entre los filamentos gruesos (García et al. 1999). Cuando el músculo se descongela, si las condiciones de conservación han sido óptimas, las fibras musculares recobran su forma original; sin embargo, si las condiciones de congelación no han sido buenas, la morfología de las fibras se verá modificada (Howgate, 1979;

García et al. 1999; Herrero et al. 2005).

1.2.4.- Cambios en los componentes musculares

Con la conservación en congelación, la estructura y movilidad del **agua muscular** se ve afectada (Herrero et al. 2005). Durante la descongelación, el agua tiende a rehidratar el músculo, pero puede existir un exceso de agua extracelular que no es reubicada y se pierde por exudación. Cuando el agua extracelular del músculo se descongela, en el lugar donde estaban los cristales de hielo se pueden formar unos canales por donde el agua fluye y contribuyen a esta pérdida de agua (Offer & Knight, 1988).

Las **proteínas miofibrilares** sufren procesos de desnaturalización y/o agregación y se han observado modificaciones en los puentes de hidrógeno, enlaces iónicos o interacciones hidrofóbicas (Belitz et al. 2009; Tejada et al. 1996). En músculo de merluza se han observado modificaciones en la estructura secundaria de las proteínas musculares más acusadas cuanto mayor es el tiempo o la temperatura de conservación (Careche et al. 1999) con un incremento de estructuras de hoja β -plegada a expensas de α hélices (Careche et al. 1999; Herrero et al. 2004). La agregación de las proteínas miofibrilares afecta principalmente a la miosina y actomiosina (Careche et al. 2002 a) de tal forma que el agregado inextraíble en disoluciones salinas, en detergentes como dodecil sulfato sódico (SDS) y en SDS más Mercaptoetanol, se enriquece en hoja β plegada (Careche et al. 2002 b). Así mismo se ha propuesto que la proporción cambios estructurales aumenta con el tiempo de conservación y varía en función de la especie, grado de integridad del músculo y temperatura de conservación (Careche et al. 1998;

Careche et al. 2002a).

Los pescados grasos son particularmente susceptibles a la degradación lipídica (FAO, 1998). En los **lípidos** del pescado ocurren dos reacciones diferentes, de importancia en el deterioro de la calidad: oxidación e hidrólisis que dan como resultado la producción de una serie de sustancias, de las cuales algunas tienen sabores y olores desagradables. La oxidación ocurre por un proceso autocatalítico a través de una serie de reacciones en cadena en la que se forman hidroperóxidos y posteriormente productos secundarios de la oxidación como aldehídos, cetonas, alcoholes o ácidos carboxílicos que originan un extenso espectro de olores y en algunos casos decoloración a tonos amarillentos (FAO, 1998; Ros et al. 2010). Las reacciones de hidrólisis tanto de triglicéridos como de fosfolípidos producirán ácidos grasos libres que pueden afectar a la textura del músculo (Shenouda, 1980). Por su alto contenido en grasa, los efectos de la alteración lipídica son más pronunciados en las especies grasas hasta el punto de ser el factor limitante del tiempo de vida útil en estado congelado (Aubourg, 1999; FAO, 1998). En especies magras también puede tener importancia y en particular existe hidrólisis de lípidos en diferentes especies magras (Aubourg et al. 1999; Aubourg et al. 2007; Aubourg & Medina, 1999; Sánchez Alonso et al. 2012).

Con la conservación en congelación, los constituyentes minoritarios del pescado como los minerales disueltos y los compuestos nitrogenados no proteicos pueden verse afectados. En particular, en algunas especies de pescado, fundamentalmente del orden gadiforme, con la congelación, se produce la degradación del TMAO, por la acción de la óxido de trimetilamina desmetilasa (TMAOasa), a **dimetilamina** (DMA) y **formaldehído** (FA) en cantidades equimoleculares (FAO, 1998; Shenouda, 1980). La

enzima TMAOasa, es activa en vísceras (bazo y riñón principalmente), en músculo y en la piel y la presencia de oxígeno o los compuestos oxidantes como los lípidos oxidados inhiben la reacción (Careche & Tejada, 1990; Sotelo & Rehbein, 2000). La TMAOasa, puede tener actividad por debajo de los -29 °C, aunque esta actividad es menor al disminuir la temperatura de congelación (Sotelo & Rehbein, 2000). La formación de FA puede producir desnaturalización y agregación de proteínas del músculo, en particular miosina (Careche & Li-Chan, 1997) y contribuir al deterioro del pescado afectando a su textura (Sotelo & Rehbein, 2000).

Los cambios estructurales, físico-químicos y bioquímicos arriba mencionados están en muchos casos interrelacionados y la figura 1.6 resume esquemáticamente las principales alteraciones que conducen a cambios en textura y la interacción entre estos eventos.

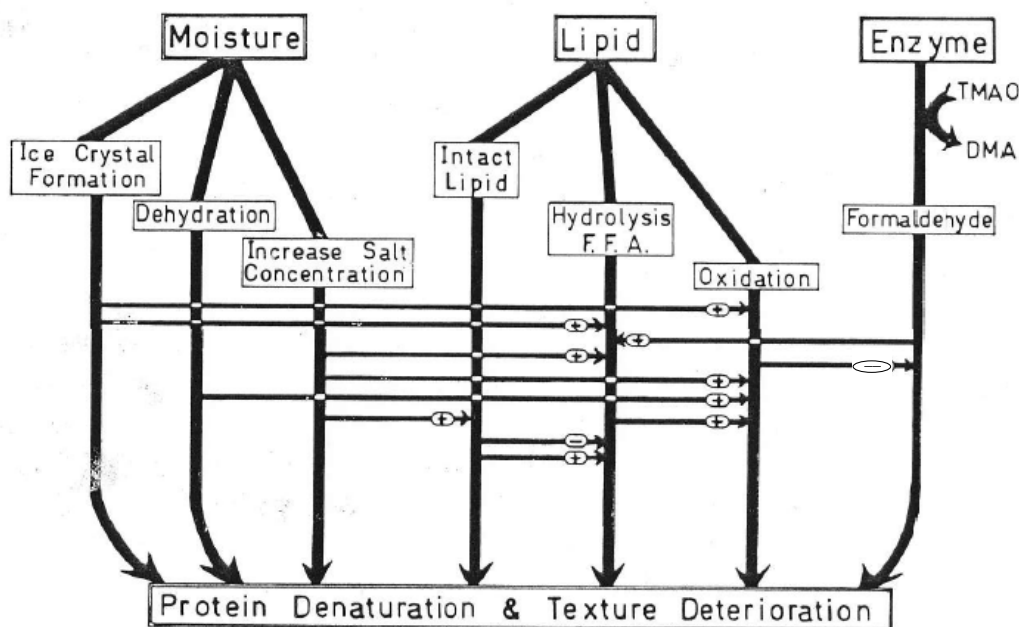


Figura 1.6: Esquema resumen de las alteraciones ocurridas en el músculo de pescado conservado en estado congelado (adaptado de Shenouda, 1980)

1.3.- APLICACIONES DE LA RELAXOMETRÍA ^1H RMN DE BAJO CAMPO EN MIOSISTEMAS

1.3.1.- Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

El fenómeno de la RMN está basado en el hecho de que los núcleos de los átomos tienen propiedades magnéticas que pueden ser utilizadas para obtener información química (Lambert & Mazzola, 2004). Las partículas elementales del núcleo atómico (protones y neutrones) poseen una propiedad denominada espín nuclear. Esta propiedad está determinada por el número cuántico del espín (I). Cuando una partícula tiene espín existe un movimiento de rotación de las partículas subatómicas alrededor de su eje y dicho movimiento puede ser definido por su momento angular que está cuantizado. Esto significa que tanto la magnitud como la orientación del momento angular sólo pueden tomar valores en un intervalo restringido. Debido a este momento angular existe un número cuántico m asociado a I y se conoce como número cuántico magnético que dará información sobre las distintas orientaciones que puede tomar un núcleo al girar y puede tomar valores desde $+I$ hasta $-I$. (Lambert & Mazzola, 2004).

En general, el espín es intrínseco del núcleo y está determinado por el número desapareado de partículas subatómicas (protones y neutrones) que lo forman. De este modo si hay un número par de protones y un número par de neutrones, como es el caso de el ^{12}C , ^{16}O , ^{32}S , los espines se cancelan unos con otros es decir, $I=0$ y por eso el núcleo de los átomos no tiene espín. Así estos átomos serán invisibles para los experimentos con RMN. Cuando el número atómico, la masa atómica o ambos son impares, el núcleo tiene propiedades magnéticas. Los núcleos de los átomos que poseen

un número impar de protones o de neutrones, como ^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{15}N , ^{19}F , ^{23}Na , tienen una distribución de carga nuclear esférica y poseen un espín cada uno de valor $1/2$. Si existe un número impar de protones y un número par de neutrones como es el caso de ^{17}O , ^2H , ^{14}N no existirá una distribución de carga esférica en el núcleo, estos núcleos se llaman cuadrupolares y el valor de I será mayor o igual a 1 (Lambert & Mazzola, 2004).

Cuando una partícula gira por el fenómeno espín, genera un campo magnético individual. De este modo, asociado a cada partícula, existe un momento magnético μ . La suma vectorial de todos los momentos magnéticos de los distintos núcleos existentes en una molécula se llama magnetización macroscópica (M). En condiciones normales, M es nula debido a que la dirección de los espines está distribuida al azar y por tanto no existen propiedades magnéticas asociadas (Lambert & Mazzola, 2004).

Comportamiento del espín en un campo magnético externo.- Cuando los núcleos de los átomos que tienen espín entran en contacto con un campo magnético externo (B_0), crean su propio momento magnético y se orientan según la dirección de B_0 . Ésta puede ser paralela a B_0 ($m = 1/2$) o bien opuesta a B_0 ($m = -1/2$). El estado de menor energía, será el estado de $m = 1/2$, que será el más estable y el que estará más poblado. La diferencia de energía entre los dos estados de espín es proporcional a la fuerza del campo magnético aplicado B_0 (Lambert & Mazzola, 2004).

Como consecuencia de la aplicación de B_0 , las partículas subatómicas comenzarán a girar con un movimiento llamado de precesión nuclear (figura 1.7). Este movimiento es el que se produce cuando la partícula gira alrededor de un eje que no es el de rotación del espín en condiciones normales y se debe al ángulo creado por el

vector del momento magnético, μ que aparece tras aplicar al sistema un campo B_0 . A este ángulo se le denomina ángulo de precesión o ángulo θ . De este modo, la partícula describe un movimiento circular orientado en la dirección del campo B_0 con un determinado ángulo de precesión (Lambert & Mazzola, 2004). El movimiento de precesión se origina con una frecuencia angular (ω) determinada. A esta frecuencia, se la conoce como frecuencia de Larmor o frecuencia de resonancia y se define por la ecuación: $\omega = -\gamma B_0$ donde ω es la frecuencia de Larmor, B_0 indica el campo magnético externo, y γ es el radio giromagnético. Esta constante tiene un valor preciso para cada especie nuclear (Lambert & Mazzola, 2004). Físicamente el radio giromagnético del núcleo es el radio de su momento angular. En general la unidad de medida de ω serán los megahercios (Lambert & Mazzola, 2004).

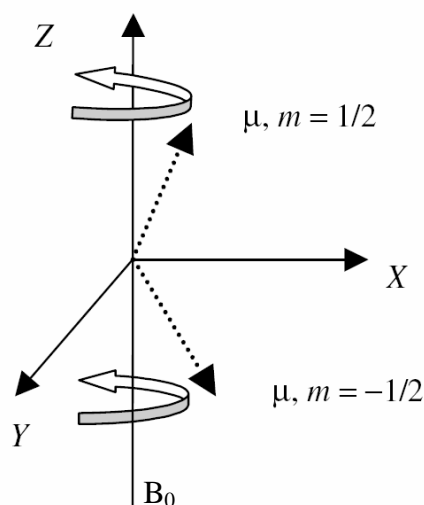


Figura 1.7: Esquema del movimiento de precesión de las partículas subatómicas cuando se somete a un campo B_0 (Bakmutov, 2004)

Excitación de los espines. Obtención del espectro de RMN.- Para producir la excitación de los espines de una determinada molécula, y por tanto la posterior obtención del espectro de RMN, es necesario crear un estado de resonancia. Para ello,

las partículas son sometidas a un pulso de radiofrecuencia con una nueva componente magnética que dará lugar a un campo adicional denominado B_1 . A efectos prácticos, el efecto de la resonancia magnética consiste en la aplicación de una radiación que opere a la frecuencia de Larmor cuya dirección del campo B_1 sea perpendicular a la dirección de B_0 . En general, la duración del tiempo del pulso de radiofrecuencia al que son sometidas las partículas hará variar el ángulo θ , así, por ejemplo un pulso de 90° será aquel que durante un tiempo determinado consiga desplazar el ángulo θ 90° de su posición inicial (Lambert & Mazzola, 2004).

El pulso de radiofrecuencia, producirá una absorción de energía por parte de la partícula, provocando una transición de un estado a otro de energía. Así los espines con $m = 1/2$ cambiarán su estado al nivel cuántico de mayor energía $m = -1/2$. De este modo, se provoca un aumento del número de estados con espín $m = -1/2$ y una disminución de estados con espín $m = 1/2$. Para que este fenómeno ocurra, es necesario aplicar una radiación de radio frecuencia que tenga un nivel de energía determinado y esta energía es el valor de la diferencia de energía existente entre los dos estados de precesión paralelos u opuestos a B_0 (Lambert & Mazzola, 2004).

Cuando esta transición de energía ocurre, las partículas comenzarán a precesar en fase. Este movimiento ocurre cuando la mayoría de las partículas tienen un movimiento de precesión con estado $m = -1/2$ y surge cuando los momentos magnéticos de los espines se suman debido al estado de mayor energía de la mayoría de dichos espines. De este modo, el vector de magnetización de los espines será distinto de cero y puede dar lugar a dos componentes diferentes: Componente longitudinal y componente transversal. El componente o magnetización longitudinal (M_z) es el resultado de la

descomposición del vector de magnetización a lo largo del eje Z, es decir el vector de magnetización está paralelo al eje longitudinal del campo B_0 . Esto se consigue únicamente al incidir la radiación magnética de B_0 , ya que todos los espines se orientan longitudinalmente en la misma dirección que el campo magnético. Matemáticamente la componente de este vector será el resultado de la diferencia de los espines paralelos y antiparalelos a B_0 . Por otro lado, en el componente o magnetización transversal (M_{xy}) la descomposición ocurre a lo largo del plano XY por el movimiento de precesión en fase. De este modo, el componente transversal se origina cuando el vector de magnetización es forzado a moverse y deja su posición inicial (paralelo a B_0), para orientarse con un ángulo θ determinado en la dirección del campo magnético resultante B , donde $B = B_0 + B_1$ (Lambert & Mazzola, 2004; Wider, 1998). El movimiento del vector de magnetización se puede observar en la figura 1.8. Es importante destacar que dependiendo del ángulo θ formado mediante el pulso de radiofrecuencia el vector de magnetización puede desplazarse más o menos en el espacio vectorial creado y por tanto el comportamiento de los espines será diferente. Cuando se aplica un pulso de radiofrecuencia de 90° , el vector de magnetización se desplazará al plano transversal (XY) y por tanto ocurrirá una pérdida de la magnetización longitudinal y un incremento en la magnetización transversal. Si en vez de aplicar un pulso de 90° se aplica un pulso de radiofrecuencia de 180° , el vector de magnetización no se detiene en el plano transversal, continúa su movimiento y aparece un componente negativo de la magnetización longitudinal sobre el eje z, dejando de existir el componente en la magnetización transversal (Lambert & Mazzola, 2004).

Cuando el pulso cesa, el vector de magnetización debe retornar a su estado inicial y los espines nucleares excitados, tienden a recuperar espontáneamente el estado

fundamental mediante un proceso conocido como relajación. De esta forma, las partículas subatómicas emiten el exceso de energía en forma de una señal de onda a la frecuencia de Larmor que puede ser amplificada y digitalizada convenientemente obteniendo un espectro de RMN (Bruker, 2005; Lambert & Mazzola, 2004; Wider, 1998).

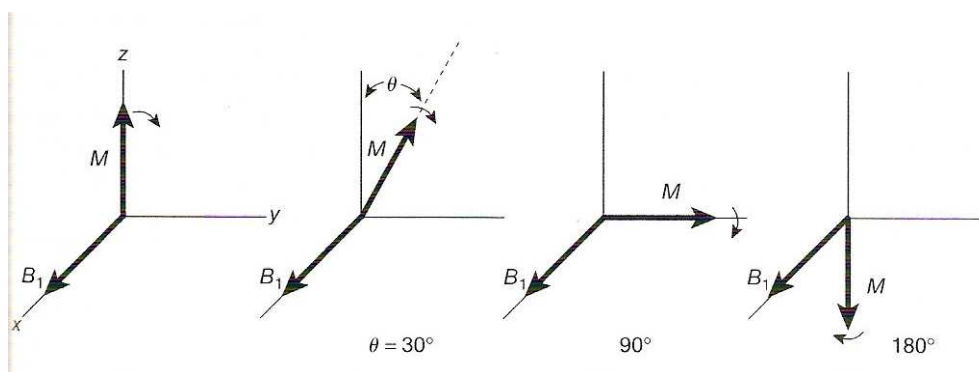


Figura 1.8: Esquema vectorial de la evolución del vector de magnetización (M) cuando la partícula se somete a un pulso de radiofrecuencia generando un campo adicional B_1 a distintos valores del ángulo θ (Lambert & Mazzola, 2004)

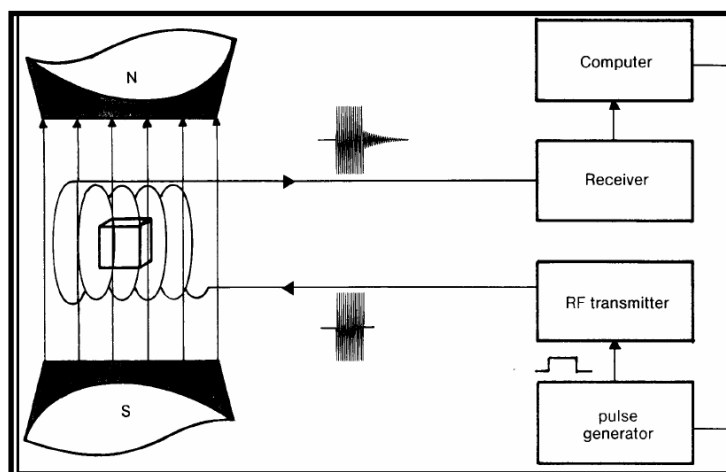


Figura 1.9: Esquema de los componentes propios de un espectrómetro de RMN (Bruker, 2005)

Un espectrómetro de RMN (figura 1.9) consta de un imán estable superconductor, con un controlador que produce un campo magnético estable de fuerza B_0 ; una sonda que contiene una o más bobinas para generar la radiofrecuencia (RF); un transmisor de radiofrecuencias, capaz de emitir frecuencias precisas; un receptor o detector muy sensible capaz de detectar señales débiles producidas por el núcleo en resonancia; un generador de pulsos de corriente alterna con la frecuencia adecuada para que produzca un campo magnético oscilante B_1 en las proximidades de la muestra y por último un ordenador para controlar los pulsos de frecuencia y para almacenar datos (Bruker, 2005).

Relaxometría RMN.- El concepto de la relaxometría se refiere al estudio de la relajación de las partículas subatómicas tras ser sometidas a un pulso de radiofrecuencia. Esta interacción es modulada por movimientos moleculares que causan transiciones y desplazamientos de frecuencia cuyo resultado es la caída de la señal de magnetización (Belton, 2011). La relajación se mide observando los componentes de magnetización longitudinal y transversal (Lambert & Mazzola, 2004). La relajación se puede caracterizar por una constante de tiempo denominada tiempo de relajación. El tiempo de relajación longitudinal o T_1 caracteriza la velocidad a la cual el componente longitudinal de la magnetización se recupera después de ser afectada por un pulso de radiofrecuencia. Al proceso mediante el cual ocurre la relajación longitudinal se denomina relajación espín-retículo ya que viene determinado por la transferencia de energía desde el sistema de los espines al medio que los rodea también llamado retículo. La relajación longitudinal, se produce por los movimientos de las moléculas del retículo cuyos núcleos tengan el número I distinto de cero. De este modo, se pueden producir campos magnéticos locales que son independientes de los campos B_0 y B_1 . Si alguno de

estos campos es igual a B_1 , se puede producir una transición de energía. De este modo, un espín que tenga un estado de energía superior, si se ve influenciado por estos campos magnéticos locales puede cambiar hacia su estado fundamental, eliminando el exceso de energía al retículo (Lambert & Mazzola, 2004). Por otro lado, el tiempo de relajación transversal o T_2 caracteriza la velocidad a la cual la componente trasversal de la magnetización decae en el plano xy. A la relajación transversal, se la denomina relajación espín-espín, pues ocurre por la interacción entre los espines. Esta interacción revela la influencia de un espín en su estado excitado sobre otro espín del mismo tipo en su estado fundamental, donde el espín excitado retorna al estado fundamental transfiriendo energía al otro espín que sufre la transición al estado excitado (Lambert & Mazzola, 2004; Wider 1998). Los tiempos de relajación se suelen encontrar en torno a los milisegundos (ms).

Para describir la relajación de la magnetización en el tiempo se utilizan unas ecuaciones fenomenológicas introducidas por Bloch et al. (1946). En estas ecuaciones, los tiempos de relajación siguen una cinética de primer orden (figura 1.10). Así la fórmula de la relajación longitudinal es $M_z = M_0(1 - e^{-t/T_1})$ y la fórmula de la relajación transversal es $M_{xy} = M_0 e^{-t/T_2}$, donde: M_z corresponde al componente de magnetización longitudinal a lo largo del eje Z; M_{xy} corresponde al componente de magnetización transversal a lo largo del plano XY; M_0 es el componente de magnetización inicial; t es el tiempo transcurrido, T_1 corresponde al tiempo de relajación longitudinal y T_2 corresponde al tiempo de relajación transversal.

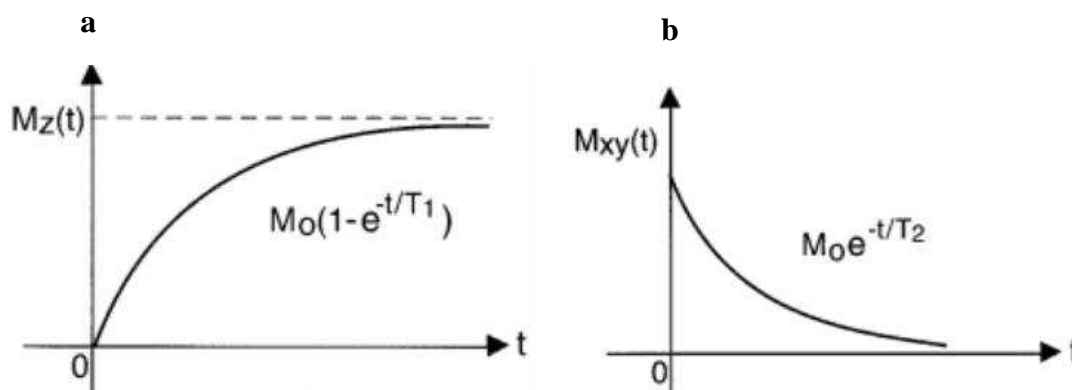


Figura 1.10: Cinéticas de primer orden de los tiempos de relajación. La gráfica a) corresponde a la cinética de los tiempos de relajación longitudinal T_1 y la gráfica b) a la cinética de los tiempos de relajación transversal T_2 (Levitt, 2008)

Dependiendo de los estudios de relaxometría que se pretendan realizar, se suelen utilizar secuencias de pulsos que modifican el ángulo θ . Así se consigue variar la situación del vector de magnetización de los espines en el espacio vectorial para producir el efecto de relaxometría deseado. En alimentos, el estudio de la relaxometría de los tiempos de relajación T_1 , se suele realizar mediante una secuencia denominada “recuperación de la inversión” (RI). En dicha secuencia, las partículas son sometidas a un pulso de 180° que crea una máxima desviación de la situación de equilibrio, llevando al vector de magnetización a la parte negativa del eje z . Tras un corto periodo denominado τ , se aplica un pulso de 90° para desplazar el vector de magnetización al plano xy desde donde el vector de magnetización volverá a su situación inicial en la parte positiva del eje z (Lambert & Mazzola, 2004).

El experimento de pulsos más usado para la determinación de la relaxometría de T_2 es utilizando la secuencia Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) (Meiboom & Gill, 1958; Purcell et al. 1946). Se puede observar un esquema de esta secuencia de pulsos en la figura 1.11.

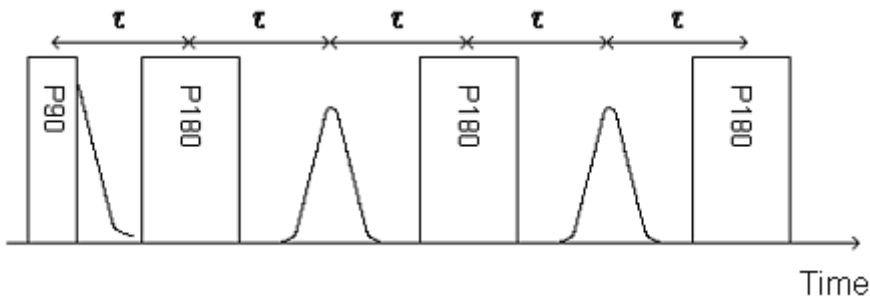


Figura 1.11: Explicación gráfica de la secuencia CPMG (Aursand, 2009)

La secuencia CPMG está asociada con la sucesiva aplicación de dos o más pulsos de radiofrecuencia. En la secuencia CPMG (figura 1.11) se usan combinaciones de pulsos de 90° y 180° . En primer lugar se aplica un pulso de 90° que llevará al vector de magnetización al plano transversal (XY). Tras un tiempo denominado tau (τ) los espines del sistema comenzarán a desfasarse y por tanto no tendrán el mismo movimiento de precesión. Tras este periodo de tiempo se aplica un pulso de 180° que hará que el vector de magnetización rote al extremo opuesto del plano. Al transcurrir otro periodo τ (en total 2τ) existe un máximo del momento del vector de magnetización. Este máximo ocurre cuando todos los espines vuelven a precesar en fase y así se inducirá una señal denominada eco. Al final del pulso de 180° todos los espines comienzan de nuevo a desfasarse y después de otro tiempo de espera τ (3τ), se vuelve a emitir un pulso de 180° y vuelve a suceder todo lo expuesto anteriormente. Este hecho se repite n veces y así se consigue lo que se llama un tren de pulsos (Meiboom & Gill, 1958; Purcell et al. 1946). De este modo, la aplicación de cada pulso de 180° ocurre en tiempos impares de τ (1τ , 3τ), mientras que los ecos se producen en tiempos pares de τ (2τ , 4τ). Con este tren de pulsos, se consigue que el vector de magnetización permanezca en el plano XY hasta que decae definitivamente cuando se deja de aplicar. De este modo, evitando que el vector de magnetización decaiga prematuramente se

pueden medir específicamente los tiempos de relajación T_2 (Meiboom & Gill, 1958; Purcell et al. 1946).

En general, en los estudios de relaxometría en alimentos, la determinación de los tiempos de relajación T_1 es más lenta que en T_2 (Van Duynhoven et al. 2010). En músculo, los tiempos de relajación T_2 han dado más información que los tiempos T_1 (Bertram & Andersen, 2004; Erikson et al. 2012) y es más común el estudio de la relaxometría del músculo mediante el uso de T_2 . Sin embargo, en sistemas alimentarios complejos se ha propuesto el uso de métodos más sofisticados como la relaxometría multidimensional donde se estudian simultáneamente ambos tiempos de relajación (Hills, 2006). Existen muy pocos trabajos que utilicen este tipo de estudios en miosistemas, aunque en el músculo de salmón Veliyulin et al. (2005), realizaron este tipo de análisis obteniendo información adicional si se compara con el análisis de relaxometría de los tiempos de relajación T_2 .

La RMN es denominada de bajo campo si opera en rangos de frecuencia de entre 2 y 25 MHz. El átomo de hidrógeno tiene un solo protón y es el más abundante en todos los tejidos orgánicos. La técnica de RMN de bajo campo de protón (^1H) se ha utilizado en mayor medida para la determinación de agua y grasa en músculo de carne. La aplicación de esta técnica en el pescado y productos de la pesca abre muchas posibilidades para relacionar el comportamiento de los protones del agua con varios parámetros tecnológicos y para el estudio de la calidad del producto fresco y almacenado en distintas condiciones (Aursand, 2009).

Interpretación físico-química de la relaxometría T_2 en la ^1H RMN de bajo campo en sistemas acuosos.- Medir la relaxometría ^1H RMN de bajo campo del agua es fácil ya que la relación señal/ruido es baja. La desventaja es la complejidad en los procesos de la relajación y el hecho de que en muchos sistemas todos los componentes contienen protones y la discriminación entre los protones de distinto origen puede ser complicada (Belton, 2011). La relajación de los protones del agua ocurre mediante el fenómeno de la interacción dipolar, intra o intermolecular, que es modulado por los movimientos de rotación y difusión de las moléculas de agua (Belton, 2011).

Un aspecto a tener en cuenta es que los protones del agua tras ser sometidos a un pulso de radiofrecuencia, pueden estar sujetos a intercambios químicos que pueden alterar su relajación. Estos intercambios ocurren cuando por distintos procesos dinámicos, el protón del agua que se está midiendo es desplazado de un entorno magnético a otro diferente. De este modo y para que se mantenga el equilibrio, este protón es reemplazado por otro (Bain, 2003). Así desde el punto de vista de la composición, la muestra no presenta signos de reacción, sin embargo los efectos del intercambio sí aparecen en el espectro de RMN (Bain, 2003). Estos intercambios pueden implicar un desplazamiento químico que ocurre cuando las frecuencias de precesión de los protones que se intercambian son diferentes. En los intercambios químicos con desplazamiento la velocidad de estos intercambios químicos dependerá de las diferencias de frecuencias de los protones que se van a intercambiar (Bain, 2003). Si la diferencia de frecuencias es grande con respecto a la velocidad de intercambio, se dice que el intercambio es lento, si por el contrario la diferencia de frecuencias es pequeña, la velocidad de intercambio es rápida (Bain, 2003). La señal medida por la relaxometría se verá muy influenciada por la velocidad de estos intercambios. De este

modo una señal en la que la velocidad de intercambio ha sido rápida tenderá a mediar el efecto del intercambio observando una sola exponencial según las ecuaciones de Bloch. Sin embargo, si el intercambio ha sido lento, el aspecto de la señal será biexponencial (Bain, 2003). Así si existen varios intercambios lentos, la señal puede ser multiexponencial.

Si el intercambio es rápido y si se ignoran los efectos del desplazamiento químico, la velocidad de relajación en presencia de intercambio puede ser descrita por esta ecuación: $R_{total} = P_a R_a + P_b R_b$. Donde P indica la fracción de una población determinada y R refleja la velocidad de relajación de cada población (Belton, 2011). En sistemas conteniendo biopolímeros, la proporción relativa de protones intercambiables en los biopolímeros es pequeña pero las velocidades de relajación son muy altas comparadas con la del agua volumétrica y por lo tanto la relajación puede estar sesgada hacia la del biopolímero.

Si existe desplazamiento químico afecta a la señal T_2 que se vuelve dependiente de la fuerza del campo y de la secuencia de pulsos. Así, la velocidad de la relajación transversal utilizando la secuencia CPMG se verá muy influenciada (Bain, 2003; Belton, 2011) y dependiendo de la escala de tiempo que se utilice para medir el tiempo de espera entre los pulsos (τ), existirán distintos valores aparentes de T_2 . Si existe una escala de tiempo que es más lenta que la velocidad del intercambio, se producirá un desfase en los espines debido a que se detecta el intercambio y existirá un valor corto de relajación y un ensanchamiento en la señal debido al intercambio (Bain, 2003; Hills et al. 1990). Si por el contrario, la escala de tiempo es más rápida que la velocidad de intercambio no habrá tiempo para detectar los intercambios (Bain, 2003; Hills et al.

1990). Así el intercambio no contribuye a la relajación y se observarán largos tiempos de relajación con valores individuales de T_2 correspondientes a los dos sitios de intercambio (Bain, 2003; Hills et al. 1990). De este modo, la dispersión de T_2 da una estimación absoluta de la velocidad del intercambio sin la necesidad de observar la separación de frecuencias (Bain, 2003).

Por otro lado, puede existir un tipo de intercambio por difusión que sucede cuando las moléculas de agua se desplazan de una región a otra intercambiando el agua (Belton, 2011). La velocidad de estos intercambios, estará muy influenciada por la distancia. De este modo, si los protones que sufren intercambio están cerca aunque en regiones diferentes, el intercambio será rápido y la relajación será monoexponencial; si por el contrario los protones están en dos regiones alejadas, el intercambio será lento y la relajación será multiexponencial (Belton, 2011).

En general, los intercambios por difusión se producen entre diferentes compartimentos de agua y sin embargo los intercambios químicos pueden ocurrir entre los protones del agua y los protones de diferentes biopolímeros que existan en el sistema (Belton, 2011; Hills et al. 1990).

A pesar de la complicación en la interpretación, las señales de ^1H son en principio altamente informativas sobre la topología, química y dinámica, pero el efecto del intercambio hace que la información sobre la dinámica del agua quede limitada (Belton, 2011).

Es importante enfatizar que en los estudios de relaxometría en alimentos, la relajación multiexponencial representa múltiples sitios de intercambio pero el número de componentes y sus intensidades relativas, no tienen porque representar el número relativo de poblaciones de agua existentes en el sistema (Belton, 2011). Otro aspecto a tener en cuenta según Belton, (2011) y Hills et al. (1990) es que cuando existe un intercambio químico entre los protones del agua y los protones de un biopolímero los tiempos de relajación no dan información del estado del agua sino fundamentalmente del estado del biopolímero en el sistema. Por lo tanto no se puede decir que la relaxometría de los protones del agua represente el “estado” del agua en un sistema alimentario (Belton, 2011; Hills et al. 1990).

Se ha tratado de explicar la evolución y las modificaciones de los parámetros de relaxometría en miosistemas. Los diferentes estudios realizados en músculo de cerdo por ejemplo Bertram & Andersen (2004) y Bertram & Andersen, (2008), mencionan el hecho de que existen intercambios, de tal forma que un intercambio lento significa una relajación multiexponencial y un intercambio rápido implica una relajación monoexponencial. Sin embargo estos autores, parecen contar con los intercambios por difusión, obviando que también existen intercambios químicos entre las proteínas miofibrilares y el agua que harán disminuir sustancialmente los tiempos de relajación. En pescado Aursand et al. (2006) propusieron que un alto valor de los tiempos de relajación significa una alta movilidad del agua y no mencionaron que los tiempos de relajación también están muy influenciados por los intercambios químicos. Pearce et al. (2011) en carne proponen que un incremento en los tiempos de relajación de los protones del agua, representa un incremento en el espacio ocupado por esas moléculas de agua, y un incremento en la amplitud de la señal de un tiempo de relajación indica un

aumento de los protones medidos a través de dicho tiempo. Así Pearce et al. (2011) no contemplan los intercambios químicos pero si interpretan el significado de los valores de la amplitud de la señal obtenida mediante relaxometría. Según el modelo propuesto por Belton y por Hills (por ejemplo Belton, 2011; Belton, 2000; Belton et al. 1988; Hills et al. 1989a,b,c; Hills et al. 1990), los tiempos de relajación observados en el agua muscular se atribuyen a una suma de diferentes fenómenos que han sido explicados en sistemas modelo con diferentes biopolímeros y agua (Belton, 2011). Así se han estudiado modelos usando geles de polisacaridos (Belton, 1997; Belton et al. 1988; Hills et al. 1989a). En otros modelos los biopolímeros utilizados fueron proteínas nativas o agregadas (Hills et al. 1988b; Hills et al. 1988c; Hills et al, 1990). También se han realizado modelos usando biopolímeros que están estructurados de una manera más organizada como las moléculas de DNA (Belton, 2000), así como en sistemas de alimentos como por ejemplo suspensiones de leche en polvo (Hills et al. (1990) o manzana (Hills & Remigereau, 1997; Hills et al. 1990).

1.3.2. Utilización de la relaxometría ^1H RMN de bajo campo en miosistemas sujetos a diferentes situaciones tecnológicas

En los sistemas musculares pueden existir alteraciones morfológicas y cambios en las proteínas miofibrilares (agregación y/o desnaturalización) que pueden producir una reorganización de los fluidos del músculo y modificaciones en sus constituyentes. Estas alteraciones dependen de diversos factores, como el estado *post mortem*, tipo y condiciones de procesado y conservación o de los tipos de tratamientos térmicos antes de su consumo. Los trabajos que se destacan a continuación han demostrado que estos cambios pueden ser detectados a través de las variaciones observadas en los parámetros

medidos en la relaxometría ^1H RMN de bajo campo obteniendo información tanto estructural como dinámica en diferentes condiciones. Además se han realizado estudios que demuestran que estos parámetros pueden ser correlacionados con otros tipos de parámetros físico-químicos utilizados para medir determinados aspectos la calidad de los productos.

Condiciones *post mortem*. En músculo de cerdo en *prerigor* las células musculares comienzan a hincharse por efecto de un incremento en la osmolaridad intracelular. En estas condiciones se ha observado un incremento en el tiempo de relajación T_{21} atribuido a un incremento del volumen entre las miofibrillas (Bertram et al. 2004a). Durante el *rigor* estos autores observaron por un lado una disminución del tiempo de relajación T_{21} que se interpretó como consecuencia de la disminución de la longitud del sarcómero por efecto del *rigor mortis*, y por otro un incremento en la amplitud del tiempo de relajación T_{22} , así como una disminución en la amplitud del tiempo de relajación T_{21} , atribuidos estos dos últimos al agua expulsada del espacio intramiofibrilar al espacio extramiofibrilar (Bertram et al. 2004a). Los autores en este y otra serie de estudios han interpretado la señal de RMN durante los eventos *post mortem* en términos de una reorganización del agua en el músculo durante la conversión del músculo en carne, asociando los movimientos del agua con procesos físicos de contracción y desestabilización de la membrana que ayudan a la pérdida de agua por exudación (Bertram & Andersen, 2008).

Músculo conservado en salazón. La relaxometría ^1H RMN de bajo campo se ha utilizado para estudiar los procesos de salado y ha proporcionado información que se ha relacionado con la dinámica del agua en los tejidos de salmón (*Salmo salar*) y de

bacalao (*Gadus morhua*) (Aursand et al. 2008). Así, se observa un aumento en los tiempos de relajación cuando estos pescados son salados a una concentración del 15 %. Si se satura el producto de sal (concentración del 25 %) se observa una disminución de los tiempos de relajación (Aursand et al. 2008). Los autores indican que existe una disminución de la amplitud de T_{21} y un aumento de la amplitud de T_{22} cuando el pescado se conserva en salazón, atribuido a la desnaturalización de las proteínas (Aursand et al. 2008). Otros autores han observado una disminución de T_{21} en bacalao salado que se ha atribuido a este mismo efecto de desnaturalización proteica (Gudjónsdóttir et al. 2011).

Condiciones de congelación y conservación en estado congelado. Los estudios de relaxometría ^1H RMN de bajo campo se han utilizado también en el estudio de los cambios ocasionados en el músculo del pescado a consecuencia de la conservación en congelación. Uno de los primeros trabajos se realizó en músculo de rana donde se observaron tres tiempos de relajación diferentes (Belton et al. 1972). Jensen et al. (2002) en bacalao observaron 4 tiempos de relajación a los 37, 56, 126 y 361 ms, cuyas amplitudes variaban dependiendo de la temperatura de conservación escogida. Lambelet et al. (1995) observaron que en esta especie existía una disminución del tiempo de relajación T_{21} durante la conservación en congelación y detectaron la aparición de un tiempo de relajación extra entre los 100 y los 400 ms que no aparecía cuando el músculo estaba fresco. La aparición del tiempo de relajación T_{22} parecía estar asociado a una pérdida de agua por exudación procedente de la descongelación que probablemente esté influenciado por la desnaturalización de las proteínas miofibrilares (Lambelet et al. 1995). En esta misma línea, Sánchez-Alonso et al. (2014) después de la congelación mediante diferentes métodos, identificaron en merluza un tiempo de relajación extra

entre los 120 y los 360 ms. Sánchez-Alonso et al. (2014) además observaron que los cambios en los parámetros de relaxometría son sensibles a los diferentes métodos de congelación utilizados. Estos mismos autores sugieren una asociación entre los procesos observados mediante relaxometría y las alteraciones morfológicas así como a la desnaturalización de las proteínas miofibrilares como consecuencia de las diferentes condiciones de congelación y conservación (Sánchez-Alonso et al. 2014). También se ha detectado en músculo de cerdo que la congelación y conservación durante largos periodos de tiempo produce cambios pronunciados en la señal de relaxometría (Mortensen et al. 2006).

En carne de cerdo, la temperatura de congelación implicó la existencia de cambios en los tiempos de relajación T_2 (Mortensen et al. 2006). En bacalao se ha observado que a bajas temperaturas de conservación el tiempo de relajación T_{22} fue más bajo que a altas temperaturas (Lambelet et al. 1995; Steen & Lambelet, 1997). Sánchez-Alonso et al. (2014) observaron que en el músculo de merluza existió una dependencia de los parámetros obtenidos mediante la relaxometría con la temperatura de conservación existiendo una interacción entre temperatura y velocidad de congelación.

Efecto de aditivos. Se realizó un estudio de los efectos producidos por el tripolifosfato de sodio en el agua muscular de gamba congelada y ambos, T_{21} y T_{22} aumentaban con la adición de este compuesto que se atribuyó al aumento del espacio entre los miofilamentos (Carneiro et al. 2013) ya que el tripolifosfato de sodio hace incrementar el pH, provocando una repulsión electrostática entre las proteínas y un hinchamiento en las células musculares.

Efecto del cocinado. En músculo de cerdo se ha observado que el tratamiento térmico por encima de 40 °C lleva consigo un proceso de desnaturalización de la miosina que produce una contracción de la carne y está relacionado con una expulsión de agua de la matriz miofibrilar al exterior, que repercute en la calidad (Bertram et al. 2004b). Micklander et al. (2002) observaron que en los análisis de relaxometría del músculo de cerdo cocinado por encima de 40 °C disminuyó la amplitud del tiempo de relajación T_{21} e incrementó la amplitud del tiempo T_{22} . También existió una disminución del tiempo de relajación T_{21} , atribuido por los autores a un menor espacio intramiofibrilar, y un incremento en el tiempo de relajación T_{22} (Micklander et al. 2002). A 60 °C apareció un tiempo de relajación extra alrededor de 1 s (T_{23}) que correspondió al agua libre expulsada de la carne mezclada con una alta concentración de proteínas (Micklander et al. 2002).

Combinaciones de tipos de procesado y conservación. En músculo de bacalao utilizando tratamientos combinados como la conservación en congelación y posterior salazón no se detectaron variaciones si el músculo era previamente congelado (Erikson et al. 2004). Sin embargo en salmón se detectaron diferencias, indicando un aumento del tiempo de relajación T_{21} así como de su amplitud y un aumento de la amplitud del tiempo de relajación T_{22} después del proceso de salado (Aursand et al. 2009). Estos cambios parecían ser debidos al aumento de tamaño de los espacios en las fibras musculares cuando el músculo ha sido sometido a congelación, sumado al proceso de hinchamiento que sufren las fibras cuando el músculo se somete a salazón (Aursand et al. 2009).

Løje et al. (2007) realizaron un análisis de la distribución de T_2 en salmón ahumado y conservado a 2 °C durante 20 días. Observaron 3 poblaciones diferentes a los 30, 50 y 180 ms aproximadamente. Además, se detectó que el tamaño de la primera población incrementó, mientras que el tamaño de la segunda población disminuyó a lo largo del tiempo de conservación en frío y atribuyeron estos cambios a un incremento en la pérdida de agua debido a una probable desnaturalización de las proteínas miofibrilares que implicaría una pérdida de calidad del producto.

Otros estudios han abordado el proceso de cocinado de músculo de cerdo previamente congelado. En estas condiciones aparece un tiempo T_{21} en torno a los 17 ms, un tiempo denominado T_{2x} entre los 44 y los 50 ms y otro tiempo T_{22} entre los 160 y los 200 ms (Mortensen et al. 2006). Hullberg & Bertram (2005) indicaron que en el músculo de cerdo conservado en congelación, descongelado, curado, ahumado y cocinado existía un tiempo de relajación T_{2b} a los 2 ms, un tiempo T_{21} a los 40 ms, un T_{22} entre los 600 y los 800 ms y en algunas ocasiones un tiempo extra denominado T_{2x} a los 200 ms. El mayor porcentaje de la señal estaba localizado en la población de agua que reflejaba el tiempo T_{21} con un valor aproximado de un 96 % (Hullberg & Bertram, 2005). Estos resultados parecían estar relacionados con los poros formados en el interior del músculo de cerdo a consecuencia de los tratamientos realizados (Hullberg & Bertram, 2005). Los estudios de relaxometría también se han utilizado para estudiar el envejecimiento de la carne de cerdo cuando el músculo se somete después a cocinado (Straadt et al. 2007). Se observó que en el músculo cocinado cuando se había conservado en frío durante 14 días existía una bajada en la amplitud del tiempo de relajación T_{21} atribuida por los autores a la contracción del músculo durante el cocinado

(Straadt et al. 2007).

También se han realizado análisis de relaxometría combinando distintas temperaturas de conservación. En músculo de bacalao, conservado en congelación a -20 °C y -30 °C y posteriormente en frío a 2 °C durante 21 días se encontraron 4 tiempos de relajación a los 37, 56, 126 y 361 ms. Así detectaron que el tamaño relativo de estas poblaciones era dependiente de la temperatura y del tiempo de conservación en frío (Jensen et al. 2002).

1.3.3.- Relación entre los cambios observables por relaxometría ^1H RMN de bajo campo y técnicas físico-químicas que se utilizan para evaluar la calidad del músculo

Los estudios mediante relaxometría realizados por diferentes autores han obtenido correlaciones con determinados parámetros que se utilizan habitualmente para medir la calidad del músculo. En particular se ha observado que los parámetros de la relajación T_2 se correlacionan bien con la CRA en el músculo de carne y de pescado en diferentes condiciones de procesado y conservación (Aursand et al. 2008; Bertram & Andersen, 2007; Bertram et al. 2002b; Carneiro et al. 2012; Gudjónsdóttir et al. 2011, Jepsen et al. 1999; Tornberg et al. 1993). Sin embargo, los niveles de correlación de los diferentes parámetros con la CRA son muy diferentes dependiendo de los trabajos estudiados. Bertram & Andersen, (2007) destacaron que este hecho puede ser debido a los diferentes métodos usados para medir la CRA. La alta correlación observada entre los parámetros detectados por el tiempo de relajación T_{22} y la pérdida de agua detectada por la centrifugación del músculo mediante la realización de la técnica de la CRA

(Bertram & Andersen, 2007; Bertram et al. 2002b; Tornberg et al. 1993) se ha atribuido al hecho de que este tiempo de relajación mide el agua que es expulsada del músculo a consecuencia de diferentes procesos que provocan la pérdida de la capacidad que posee el agua de adherirse a las estructuras musculares (Bertram & Andersen, 2007; Bertram et al. 2002b; Tornberg et al. 1993).

Los cambios en textura instrumental también se han correlacionado con los parámetros observados en los estudios de relaxometría tanto en carne como en pescado (Hullberg & Bertram; 2005; Steen & Lambelet, 1997). En bacalao picado congelado y descongelado se ha observado una alta correlación entre la constante de tiempo T_{22} y la resistencia a la cizalladura determinada instrumentalmente (Steen & Lambelet, 1997). Así estos autores propusieron la relaxometría como método para detectar cambios en textura cuando el músculo de pescado es sometido a congelación. En carne de cerdo, Hullberg & Bertram, (2005) detectaron que los valores obtenidos mediante textura instrumental estaban directamente relacionados con la amplitud del tiempo de relajación T_{22} e inversamente relacionados tanto con el tiempo de relajación T_{21} como con su amplitud correspondiente.

Se han obtenido buenos resultados en la correlación de los parámetros de la relaxometría con análisis sensorial realizados en carne y pescado (Hullberg & Bertram, 2005; Steen & Lambelet, 1997; Yano et al. 2002). Yano et al. (2002) observaron una buena correspondencia entre los resultados obtenidos mediante el tiempo de relajación T_{21} y el análisis sensorial en músculo de oveja y salmón. Hullberg & Bertram, (2005) observaron asimismo buenas correlaciones en músculo de cerdo con parámetros como la ternura y la jugosidad y Steen & Lambelet, (1997) en bacalao también obtuvieron

buenas correlaciones entre tiempo de relajación T_{22} y la dureza, la fibrosidad y la sequedad.

1.4.- DESARROLLO DE MODELOS PARA EVALUAR CAMBIOS EN LA CALIDAD DEL PESCADO CONGELADO Y/O ESTIMAR SU VIDA ÚTIL

Definir la calidad en un alimento es complejo ya que es un concepto amplio que engloba varios niveles jerárquicos, desde un plano general más abstracto, hasta más concreto donde se pueden definir especificaciones propias e inherentes a un producto (Bremner, 2000). En general, este último nivel es el más importante para realizar una estimación precisa en un alimento, que tendrá su propia definición de calidad, manejando unos criterios concretos y específicos para medir el nivel de aceptación o de rechazo (Bremner, 2000). Así, se pueden determinar atributos y propiedades cuantitativamente a través de métodos que proporcionan distintos valores que serán usados para evaluar el estado del producto. En el caso de aspectos de calidad relacionados con la conservación del alimento, se puede tratar adicionalmente de predecir su vida útil (Bremner, 2000; Bremner, 2004).

Los estudios en calidad en el músculo de pescado congelado se realizan principalmente mediante métodos sensoriales, físico-químicos y espectroscópicos. El análisis sensorial trata de detectar diferentes cualidades del pescado mediante la percepción por los sentidos. Los métodos físico-químicos suelen ser técnicas de análisis instrumental que tratan de evaluar las variaciones que pueden existir en diferentes propiedades funcionales, estructurales y de composición del músculo de pescado sometido a congelación. La espectroscopía por su parte también puede analizar las propiedades anteriores y permite desarrollar procedimientos de medida que pueden aplicarse sin necesidad de tratamiento de las muestras. De este modo los análisis son más rápidos y no tan laboriosos. En pescado congelado en particular los métodos más

utilizados han sido la espectroscopía dieléctrica, la espectroscopía vibracional (FTIR y Raman) y la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (^1H RMN) de bajo campo.

El Sector Pesquero ha manifestado la necesidad de métodos rápidos para medir la calidad del pescado y de sus productos (Jorgensen et al. 2003). Como en general, los análisis tradicionales son destructivos, lentos y laboriosos, en la actualidad se están desarrollando métodos más directos, rápidos y no destructivos como los espectroscópicos.

En cualquier caso se han de establecer una serie de criterios para que el producto cumpla con las definiciones específicas de aceptación y por tanto de buena calidad (Bremner, 2000; Bremner & Sakaguchi, 2000). Habitualmente es necesario recurrir a varios atributos que pueden estudiarse por separado o en conjunto. Si se realiza un estudio de atributos conjuntamente, se pueden calibrar separadamente, por ejemplo con el análisis sensorial, y producir posteriormente una función de calidad, como es el caso del “Artificial Quality Index” (Olafsdottir et al. 2004) en el que se calibraron distintos atributos del QIM (color, textura, olor) con las medidas instrumentales correspondientes (colorímetro, texturómetro, nariz electrónica).

Los indicadores pueden asimismo calibrarse de tal forma que sea posible establecer la vida útil de un producto a través de modelos que estimen su evolución en base a unos factores determinados. Es también posible unir determinadas características en grupos o clases a las que se asigna un valor de calidad determinado.

Las funciones estadísticas más utilizadas incluyen el análisis discriminante, análisis de correlación simple, análisis de regresión simple, análisis de regresión lineal múltiple y análisis de regresión por mínimos cuadrados parciales (PLSR) (Tabla 1.2). En merluza, existen varios métodos para predecir la calidad que utilizan diferentes funciones (tabla 1.2). Se han propuesto métodos para predecir el tiempo de conservación de los productos congelados de merluza a una temperatura fija, incluyendo el Quality Index Method (QIM) basado en la inspección sensorial (Herrero et al. 2003), el ensayo de compresión-relajación (Herrero & Careche 2005), utilizando espectroscopía visible (Heia et al. 2003), o una combinación de métodos tales como la viscosidad aparente de homogenizados musculares, el ensayo de penetración, y la resistencia a la cizalladura con la célula de Kramer (Herrero & Careche 2006).

Por otro lado también pueden utilizarse modelos cinéticos. El más utilizado en tecnología de alimentos es el que cumple la ley de Arrhenius. Esta ley, describe la dependencia de distintos tipos de reacciones químicas y fenómenos físicos con la temperatura (Taoukis et al. 1997; Van Boekel, 2008). La ecuación de Arrhenius se puede formular como: $k(T) = k_0 \cdot e^{-Ea/RT}$. Relaciona la velocidad de reacción específica (k) con la temperatura absoluta (T), donde R , corresponde a la constante universal de gases y Ea corresponde a la energía de activación (Taoukis et al. 1997; Van Boekel, 2008). De este modo, la Ea y k_0 pueden ser calculadas si se representa gráficamente el $\ln k$ frente a $1/T$. Así la Ea se calcula por medio de la pendiente de la recta resultante y k_0 corresponde a la ordenada en el origen (Taoukis et al. 1997; Van Boekel, 2008). En un principio, esta ecuación, se desarrolló para explicar procesos químicos, aunque se vio que podía ser utilizado con éxito en otros tipos de procesos (Taoukis et al. 1997). En general, la ecuación de Arrhenius ha sido usada para describir la velocidad de

reacción y su dependencia con la temperatura en numerosos procesos biológicos (Wright, 2003). En sistemas alimentarios, la ecuación de Arrhenius, puede ser usada para testar la vida útil utilizando modelos cinéticos de predicción (Fu & Labuza, 1993; Labuza, 1984; Taoukis et al. 1997).

Tabla 1.2: Resumen de trabajos que han realizado modelos de calidad utilizando pescado congelado

ESPECIE	MÉTODOS	FUNCIONES	OBJETIVO	REFERENCIA
<i>Merluccius merluccius</i>	-- Físico-químicos (Viscosidad aparente, textura instrumental)	Análisis discriminante	Clasificación por categorías de calidad según la historia tiempo-temperatura	Barroso et al. (1998a)
<i>Merluccius capensis</i> <i>Merluccius paradoxus</i>	-- Sensoriales	PLSR Regresión múltiple lineal	Calibración del QIM para realizar la estimación del tiempo de conservación a -20 °C	Herrero et al. (2003)
<i>Merluccius capensis</i> <i>Merluccius paradoxus</i>	-- Sensoriales -- Físico-químicos (Textura instrumental)	Correlación simple	Evaluación de la calidad mediante la utilización conjunta de métodos sensoriales y físico-químicos	Herrero & Careche, (2005)
<i>Merluccius capensis</i> <i>Merluccius paradoxus</i>	-- Físico-químicos (Viscosidad aparente, textura instrumental)	Regresión múltiple lineal	Predicción del tiempo de conservación en congelación a -20 °C	Herrero & Careche, (2006)
<i>Merluccius capensis</i>	-- Sensoriales -- Físico-químicos (Textura instrumental, viscosidad aparente, Capacidad de retención de agua, solubilidad proteica, formaldehído) -- Espectroscópicos (Espectroscopía dieléctrica)	Regresión múltiple lineal	Predicción del tiempo de conservación, de la temperatura de conservación y de atributos sensoriales	Kent et al. (2005)
<i>Urophycis chuss</i>	-- Físico-químicos (Dimetilamina) -- Espectroscópicos (FTIR)	Análisis discriminante	Análisis de distinción entre producto fresco y descongelado	Pink et al. (1998)
<i>Urophycis chuss</i>	-- Físico-químicos (Dimetilamina) -- Espectroscópicos (FTIR y FTNIR)	PLSR	Desarrollo de un modelo para estimar la cantidad de DMA mediante métodos espectroscópicos	Pink et al. (2001)
<i>Gadus morhua</i>	-- Físico-químicos (textura instrumental) -- Sensoriales -- Espectroscópicos (¹ H RMN de bajo campo)	Correlación simple	Calibración de un modelo para detectar la textura instrumental y sensorial mediante métodos espectroscópicos	Steen & Lambelet, (1997)
<i>Gadus morhua</i>	-- Sensoriales -- Físico-químicos (Capacidad de retención de agua)	PLSR	Desarrollo de un modelo para estimar la CRA mediante métodos sensoriales	Jensen & Jorgensen, (1997)

Tabla 1.2 (cont.): Resumen de trabajos que han realizado modelos de calidad utilizando pescado congelado

ESPECIE	MÉTODOS	FUNCIONES	OBJETIVO	REFERENCIA
<i>Gadus morhua</i>	-- Sensoriales -- Espectroscópicos (Espectroscopía dieléctrica)	PLSR	Predicción del tiempo y de la temperatura de conservación y de atributos sensoriales	Kent & Daschner, (2005)
<i>Merluccius capensis</i> <i>Merluccius paradoxus</i>	-- Espectroscópicos (visible)	PLSR	Predicción del tiempo de conservación	Heia et al. (2003)
<i>Pennaeus</i> sp.	-- Sensoriales -- Físico-químicos (Color, dimetilamina) -- Microbiológicos	Ecuación de Arrhenius	Creación de un modelo que estudie la vida útil	Tsironi et al. (2009)
<i>Aristichthys nobilis</i>	-- Físico-químicos (ácidos grasos libres, solubilidad proteica, actividad ATPasa, grupos SH)	Ecuación de Arrhenius	Creación de un modelo que prediga la calidad	Wu et al. (2014)
<i>Merluccius merluccius</i>	-- Espectroscópicos (FTIR)	Ecuación de Arrhenius	Creación de un modelo para estimar tiempo y temperatura de conservación.	Careche et al. (2015)

En pescado se han realizado escasos trabajos para estimar su calidad mediante modelos cinéticos. Tsironi et al. (2009) utilizaron estos modelos para monitorizar la calidad de gamba congelada mediante métodos físico-químicos, sensoriales y microbiológicos. Existe otro estudio en carpa congelada que ha sido publicado con posterioridad al inicio de esta Tesis y donde se utiliza la función de Arrhenius en la modelización de los ácidos grasos libres, el porcentaje de proteínas extraíbles, la actividad Ca^{2+} ATPasa y el contenido de grupos sulfidrilo (Wu et al. 2014).

En los métodos espectroscópicos el análisis de datos es habitualmente realizado por quimiometría (Cheng et al. 2013). Sin embargo, recientemente se han aplicado modelos cinéticos a datos espectroscópicos obtenidos por FTIR de la fracción lipídica

del músculo merluza (Careche et al. 2015), en los que se utilizaron las puntuaciones del primer componente principal en la modelización cinética y han mostrado un patrón que sigue la ecuación de Arrhenius y por lo tanto podría ser utilizado para predecir el tiempo a una temperatura dada y viceversa.

2.- JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Justificación.- El pescado es un alimento nutricionalmente muy rico que principalmente destaca por la presencia de ácidos grasos poliinsaturados, proteínas ricas en aminoácidos esenciales y por un alto contenido en minerales, vitaminas y compuestos nitrogenados no proteicos que, en conjunto, contribuyen a su alta calidad como alimento. Además posee unas características sensoriales únicas de tal forma que la configuración estructural del músculo con fibras más cortas que los mamíferos y su alta capacidad de retención de agua proporcionan al pescado una textura suave y firme y unas cualidades especiales de jugosidad.

Los productos de la pesca son muy perecederos por lo que es necesario aplicar frío inmediatamente para evitar su deterioro y la conservación en estado congelado es un método muy efectivo para prolongar la vida útil de los productos pesqueros, ya que disminuye la velocidad de muchos procesos físico-químicos y paraliza el crecimiento microbiano. Sin embargo en función del método de congelación utilizado, el tiempo y temperatura de conservación, la especie, el procesado previo a la congelación, etc., pueden ocurrir diferentes alteraciones en el producto que se traduzcan en una pérdida de calidad pudiendo llegar al fin de su periodo de vida comercial o al rechazo por parte del consumidor.

Con el fin de apoyar el cumplimiento de los reglamentos europeos sobre la información alimentaria facilitada al consumidor y la organización de mercados en los productos de pesca y acuicultura, es necesario desarrollar métodos para detectar cambios en la calidad, estimar la vida útil de los productos de la pesca o determinar si un pescado ha sido previamente congelado.

La calidad de un alimento se puede estimar en base a unos indicadores que pueden ser cuantificados mediante diferentes métodos analíticos y que suelen ser específicos para cada producto. En base a estos indicadores es posible definir una serie de criterios que pondrán de manifiesto los distintos niveles de calidad. Los indicadores pueden utilizarse asimismo para establecer la vida útil de un producto a través de modelos que estimen su evolución en base a unos factores determinados.

Es deseable que los indicadores utilizados se obtengan por métodos instrumentales rápidos, no destructivos y no invasivos. La espectroscopía permite idealmente de forma no destructiva o sin tratamiento previo del producto determinar varias propiedades o compuestos simultáneamente y monitorizar sus cambios en función de los tratamientos tecnológicos al que éste ha sido sometido.

Una alternativa es el uso de la Resonancia Magnética Nuclear de protón (^1H RMN) de bajo campo. En miosistemas se ha utilizado principalmente en el estudio de carne aunque el número de aplicaciones en productos de la pesca ha crecido considerablemente en los últimos años. Se ha observado en sistemas modelo con proteínas y otros biopolímeros así como en músculo que los tiempos de relajación transversal (T_2) pueden dar información sobre la naturaleza físico-química de los compuestos musculares y sobre su compartimentalización. En particular se pueden ver afectados los movimientos difusivos y rotacionales del agua muscular y se pueden producir intercambios químicos entre los protones del agua muscular y los protones de otras biomoléculas que afectarán a los tiempos de relajación de dichos protones.

Con el fin de definir criterios que pongan de manifiesto los distintos niveles de calidad en base a nuevos indicadores, es necesario relacionar o calibrar éstos con parámetros externos que a su vez se relacionen directa o indirectamente con la calidad, por ejemplo a través de otros indicadores físico-químicos ya utilizados previamente. Entre los utilizados para merluza conservada en el estado congelado se incluyen la capacidad de retención de agua, resistencia a la cizalladura, viscosidad aparente y los ácidos grasos libres.

La estimación de la vida útil en pescado congelado puede abordarse por medio de funciones que predigan la evolución de determinados indicadores por efecto del tiempo y la temperatura de conservación, por ejemplo, a través de modelos cinéticos ya que éstos permiten estimar el tiempo conocida la temperatura de conservación y viceversa. En el caso de parámetros espectroscópicos se requiere seleccionar previamente marcadores de todo el conjunto de datos. A pesar de su establecido uso en algunos alimentos y fundamentalmente en refrigeración, los modelos cinéticos se han utilizado poco en pescado refrigerado, apenas en pescado conservado en estado congelado y, salvo algún trabajo previo del equipo, no se había utilizado el conjunto de datos espectroscópicos en la modelización cinética.

Hipótesis.- Por lo tanto, teniendo en cuenta: a) la importancia que tiene el agua y las proteínas musculares en los cambios estructurales, físico-químicos y sensoriales asociados a la pérdida de calidad de merluza congelada, b) que los compuestos musculares y su organización estructural pueden verse afectados por diferentes condiciones de congelación y conservación, c) que los tiempos de relajación transversal (T_2) de la relaxometría ^1H RMN de bajo campo pueden dar información sobre la

naturaleza físico-química y estructural de los compuestos musculares, se propone como hipótesis en la presente memoria que esta espectroscopía puede utilizarse como herramienta para establecer diferencias entre las condiciones de conservación asociadas a varios niveles de calidad y tiempos de vida útil. Unos resultados positivos permitirían proponer métodos alternativos o complementarios a los ya existentes.

Objetivos.- La hipótesis de trabajo ha permitido plantear el siguiente objetivo general y consiguientes objetivos parciales:

Objetivo general.- El objetivo general fue explorar las posibilidades de la relaxometría ^1H RMN de bajo campo para proporcionar indicadores que, en su caso, pudieran utilizarse como herramienta para estimar la calidad y/o vida útil del producto.

Objetivos parciales.- Este objetivo general requirió optimizar el método de relaxometría para las condiciones de congelación estudiadas. Para estimar la calidad y/o vida útil del producto, inicialmente se requería estudiar la evolución en el tiempo a una temperatura fija y en una segunda fase, a varias temperaturas y tiempos. En tercer lugar, se precisaba comparar esta evolución con marcadores físico-químicos cuyo uso estuviera bien establecido para esta especie conservada en estado congelado de tal forma que los resultados de relaxometría se pudieran correlacionar con estos métodos directamente o bien establecer una comparación entre ellos a través de sus correspondientes modelos cinéticos. Esta modelización cinética no se encontró en la literatura en el caso de los marcadores utilizados habitualmente para este fin, por lo que fue necesaria no sólo para el caso de la relaxometría sino también para los otros marcadores físico-químicos. En consecuencia, se plantearon los siguientes objetivos parciales:

1. Optimizar las condiciones del análisis del músculo de merluza descongelado mediante relaxometría ^1H RMN de bajo campo.
2. Estudiar la evolución de los parámetros de la relaxometría ^1H RMN de bajo campo a una temperatura fija y determinación de su posible utilidad en la estimación de la calidad y vida útil en base a su relación con otros parámetros físico-químicos y con el tiempo de conservación.
3. Obtener modelos cinéticos en músculo de merluza congelado con indicadores físico-químicos cuya relación con la calidad esté bien establecida para esta especie y condiciones de congelación.
4. Analizar la evolución de los parámetros obtenidos por relaxometría ^1H RMN de bajo campo en músculo de merluza congelado en función del tiempo y de la temperatura de conservación. Obtener un modelo cinético en base a estos parámetros y relacionarlo con otros modelos cinéticos.

Experimentos.- Para la consecución de los objetivos descritos en esta memoria, se plantearon varios experimentos:

- A. Las condiciones más apropiadas para la realización de los análisis de relaxometría ^1H RMN de bajo campo (objetivo 1) se efectuaron con diferentes lotes de merluza adquiridos en un mercado local.
- B. Se llevó a cabo un experimento de conservación de merluza a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se realizaron análisis de relaxometría ^1H RMN de bajo campo y análisis de resistencia a la cizalladura, CRA y viscosidad aparente que se consideran buenos indicadores de la calidad tecnológica del músculo de pescado. Con este experimento se abordó el objetivo 2 de la presente memoria.
- C. Tras confirmar las posibilidades de utilizar la relaxometría ^1H RMN de bajo campo como indicador de la calidad a una temperatura fija, se realizó un nuevo experimento añadiendo como factor la temperatura de conservación. Este fue el experimento principal de la Tesis donde se estudió la evolución de los parámetros espectroscópicos y de la CRA, resistencia a la cizalladura y el perfil de ácidos grasos totales y libres a -10 , -20 , -30 y $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un tiempo total de 3 años. Este experimento se utilizó en la consecución de los objetivos 3 y 4.

Los experimentos realizados, los análisis instrumentales, así como los análisis de datos para la consecución de los objetivos planteados en esta Tesis están resumidos en la tabla 2.1.

Tabla 2.1: Relación entre objetivos, experimentos y análisis realizados

OBJETIVO	EXPERIMENTO	SECCIÓN DE RESULTADOS	ANÁLISIS INSTRUMENTAL	ANÁLISIS DE DATOS
Optimización de las condiciones de análisis	A	4.1	^1H RMN de bajo campo	ANOVA
Evolución y relación de los parámetros espectroscópicos y físico-químicos a una temperatura fija	B	4.2	Análisis elementales y pH CRA Resistencia a la cizalladura Viscosidad aparente ^1H RMN de bajo campo	ANOVA Regresión lineal Correlación Regresión por mínimos cuadrados parciales Componentes principales
Evolución y relación de los parámetros físico-químicos en función de la temperatura y el tiempo de conservación. Búsqueda de modelos cinéticos	C	4.3 4.4	Análisis elementales y pH CRA Resistencia a la cizalladura Acidos grasos totales Acidos grasos libres	ANOVA Regresión lineal Modelización cinética
Evolución y relación de los parámetros espectroscópicos en función de la temperatura y el tiempo de conservación. Búsqueda de modelos cinéticos	C	4.5	^1H RMN de bajo campo	ANOVA Componentes principales Regresión lineal Modelización cinética

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- DISEÑO EXPERIMENTAL, MATERIA PRIMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

3.1.1.- Optimización de las condiciones de ensayo en relaxometría ^1H RMN de bajo campo

Para la consecución del primer objetivo, se planteó el diseño experimental reflejado en la figura 3.1.1 (experimento A). Se utilizaron cinco merluzas (*Merluccius merluccius* L.) adquiridas congeladas (4 días a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$) en un comercio local (Pescaderías Coruñesas, Madrid). Los filetes se transportaron a las instalaciones del ICTAN donde se conservaron en una cámara de congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (DWM Copeland DLL-401). Se evaluaron varias temperaturas (0, 2, 4, 6 y $10\text{ }^{\circ}\text{C}$) y tiempos (20, 30, 40, 60, 80, 100, 120 y 140 minutos) de preparación previo al análisis de ^1H RMN de bajo campo. Se analizó una temperatura de preparación por día y los experimentos se replicaron en dos días.

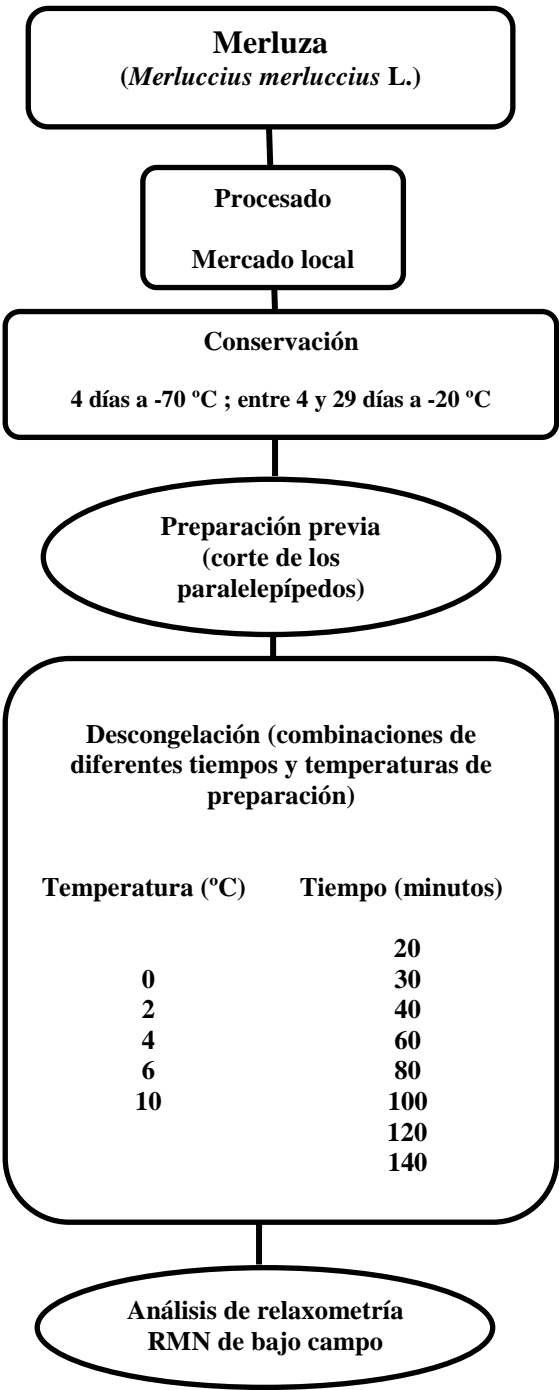


Figura 3.1.1: Diseño del experimento A

3.1.2.- Experimento con merluza conservada a -10 °C

La figura 3.1.2 (experimento B) muestra un esquema de preparación de muestras, tipo y cadencia análisis en este experimento utilizados en el objetivo 2. Se partió de cincuenta merluzas (*Merluccius merluccius* L.) capturadas el 2 de noviembre de 2008 en el Atlántico Noreste zona Fao 27. El pescado eviscerado a bordo desembarcó en Puerto de Celeiro (Lugo) y se transportó a Mercamadrid desde donde se trasladó al ICTAN.

Tras su llegada al laboratorio, los 50 ejemplares de merluza se inspeccionaron visualmente, se pesaron y se midieron ($1,75 \pm 0,13$ kg y $57,49 \pm 2,02$ cm). Después el pescado se fileteó (figura 3.1.3), manteniendo en todo momento una temperatura inferior a 4 °C. Los filetes de 5 individuos se conservaron en refrigeración y el resto se introdujeron en un congelador de aire forzado (AGA Frigoscandia, Freezer Division Helsingborg, Suecia), durante un periodo de 90 minutos a máxima potencia. Tras la congelación, se envasaron en bolsas CRYOVAC (Barrier Bag BB3050), previamente rotuladas identificando el número de individuo, la orientación del filete (filete derecho o izquierdo), la temperatura de conservación y la fecha de envasado. Las bolsas se sellaron sin vacío en una envasadora/selladora (Multivac A300/52, Wolfertschwenden, Alemania). De los 45 individuos congelados, 36 se conservaron a -10 °C (congelador Liebherr GGPv 5520, Liebherr GmbH, Korneuburg, Austria) y 9 a -80 °C (Thermo Scientific Forma 700 series, Thermo Fisher Scientific, EE.UU). Los filetes de merluza fresca se analizaron tras 48 horas de conservación en refrigeración (Control A). Los filetes almacenados a -80 °C se analizaron con un total de 3 tiempos de análisis y constituyeron el control B. Los filetes almacenados a -10 °C se analizaron con una

cadencia de dos semanas hasta un total de 11 tiempos de análisis. Se utilizaron 3 individuos (seis filetes) en cada muestreo. En los análisis elementales se utilizó como muestra una mezcla de músculo de 5 individuos diferentes que se conservaron a -80 °C hasta que se procedió a su análisis.

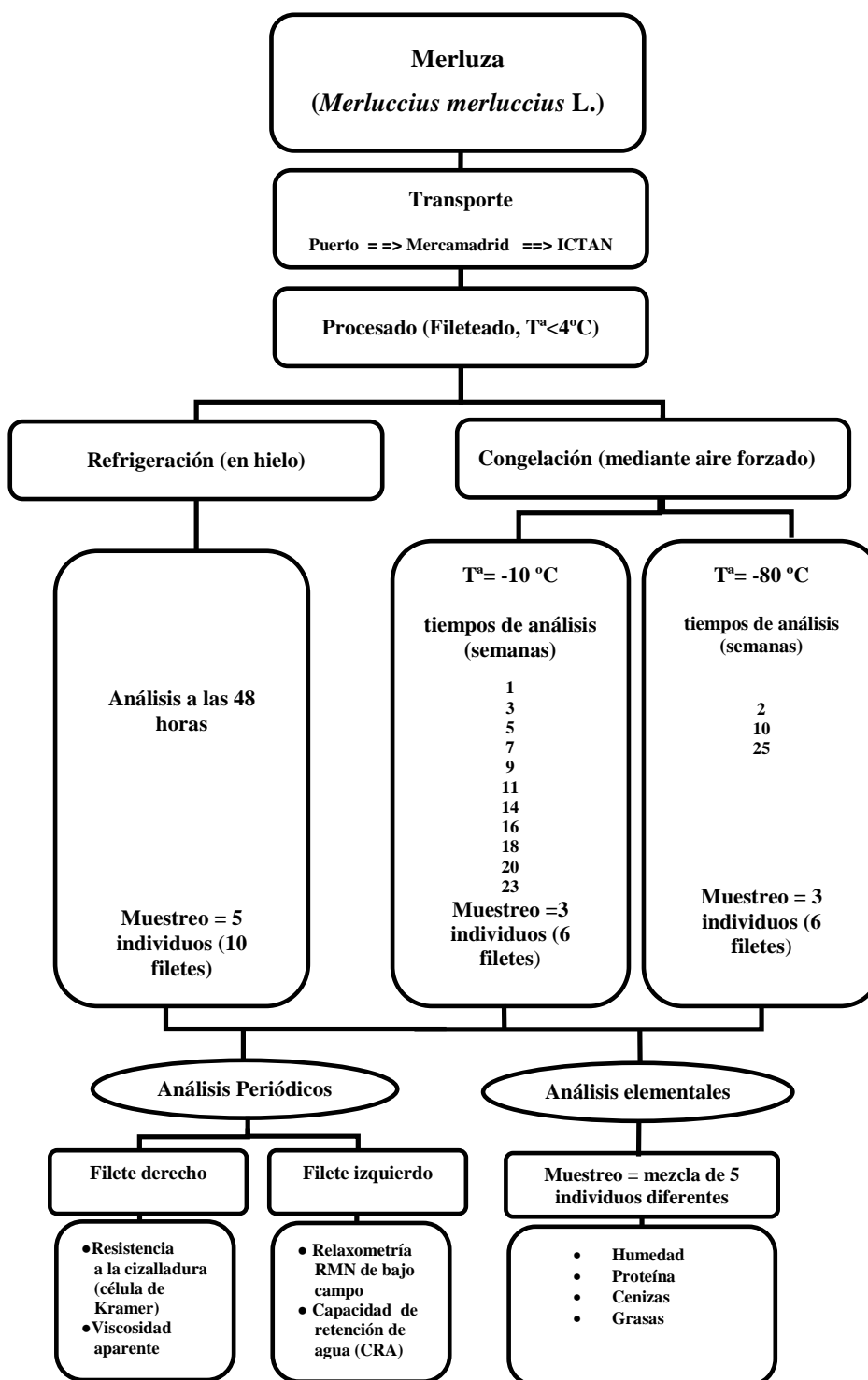


Figura 3.1.2: Diseño del experimento B



Figura 3.1.3: Imágenes del procesado de la materia prima

3.1.3.- Experimento con merluza conservada a -10, -20, -30 y -80 °C

La figura 3.1.4 muestra un esquema del diseño del experimento C encaminado a cubrir los objetivos 3 y 4. Se utilizaron ciento noventa merluzas (*Merluccius merluccius* L.) capturadas el 16 de noviembre de 2009, en el Atlántico Noreste zona FAO 27. El pescado se evisceró a bordo y llegó a tierra a las 24 horas tras su captura. En las instalaciones de Puerto de Celeiro S. A. se realizó la inspección visual y se anotaron los pesos de cada individuo ($1,81 \pm 0,19$ kg). Tras eliminar las escamas y las cabezas, los individuos se lavaron para quitar restos de vísceras y finalmente se filetearon. Los filetes de cada individuo se envasaron en bolsas de plástico (figura 3.1.5 a) (ARIEX-3, Arias, Industrias Plásticas, Lugo, España), se etiquetaron y sellaron sin vacío en una envasadora (VP-800, Ramón S.L., Vilassar de Dalt, Barcelona, España). La temperatura durante la manipulación se mantuvo por debajo de 7 °C. Los filetes de 5 individuos se

conservaron en refrigeración hasta su análisis 48 horas después y el resto de los filetes se congelaron en un congelador de aire forzado (RF 201 AB, Fagor, Mondragón, España) hasta que la temperatura interna de los filetes alcanzó -20 °C (una hora) (figura 3.1.5 b). Se transportaron en un tiempo aproximado de 24 horas en cajas de poliestireno con hielo seco desde el Puerto de Celeiro hasta las dependencias del ICTAN. Los filetes se separaron en 4 lotes que se almacenaron a -10 °C (congelador Liebherr GGPv 5520, Liebherr GmbH, Korneuburg, Austria), -20 °C (cámara de congelación del IF-ICTAN, DWM Copeland DLL-401), -30 °C (congelador Radiber CVED-310-30, Radiber S.A., Barcelona, España), y -80 °C (congelador Nuaire Glacier -86, Nuaire, Inc., EEUU). Los filetes almacenados a -10 °C se analizaron hasta las 23 semanas, los conservados a -20 °C hasta 104 semanas, a -30 °C hasta 147 semanas, y aquellos que se conservaron a -80 °C hasta 150 semanas. Cada día de muestreo se analizaron filetes de cinco individuos. En los análisis elementales se utilizó como muestra una mezcla de músculo de 5 individuos diferentes que se conservaron a -80 °C hasta que se procedió a su análisis.

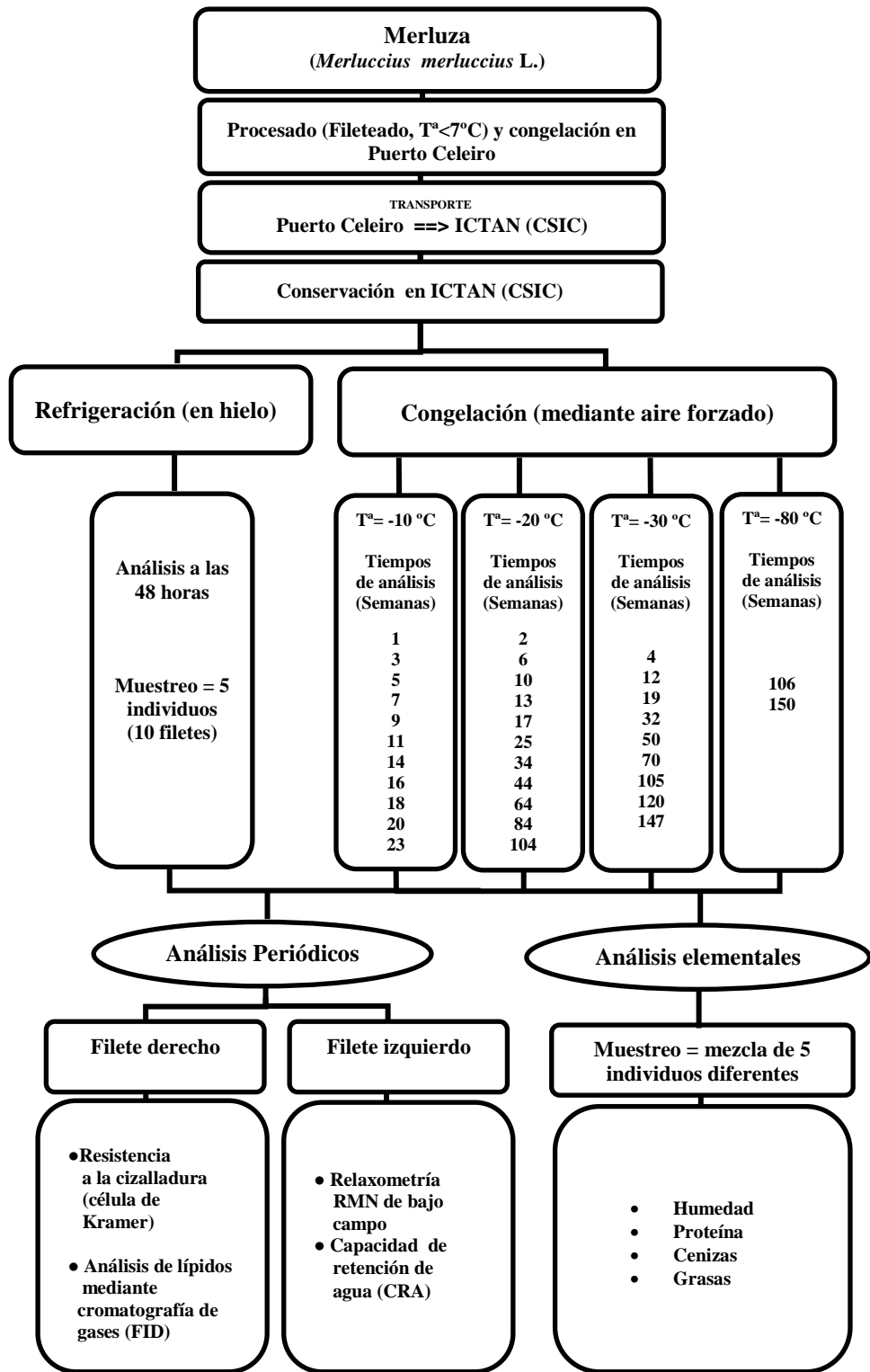


Figura 3.1.4: Diseño del experimento C

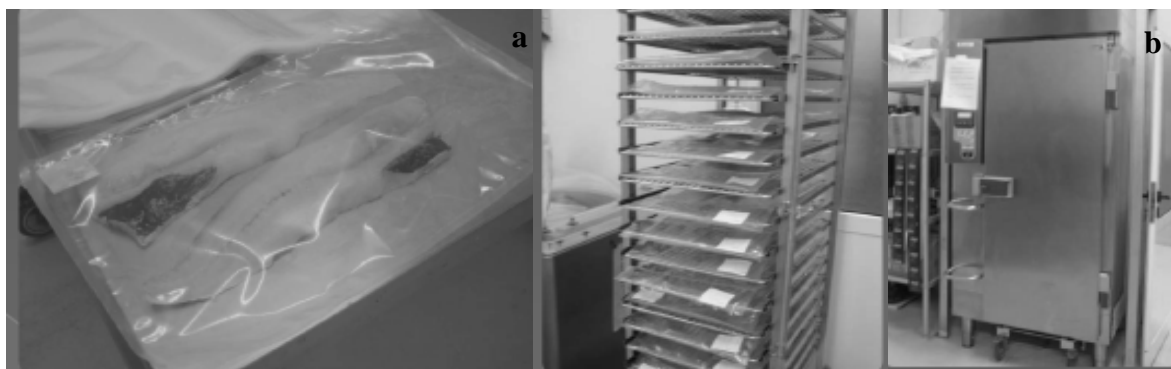


Figura 3.1.5: Imágenes del envasado (a) y de la congelación mediante aire forzado (b) del experimento C

3.2.- ANÁLISIS ELEMENTALES Y pH

Se determinó el porcentaje de humedad siguiendo el método oficial de la AOAC, (1995). Se utilizaron cápsulas de aluminio previamente taradas en las que se introdujeron 5 gramos de muestra. Éstas se llevaron a una estufa (JP Selecta Therooven, JP Selecta S.A., Abrera, Barcelona, España) a 100 °C. Transcurridas 24 horas, las cápsulas se sacaron de la estufa y se pesaron en una balanza (AND modelo FR-200, A&D Engineering, Inc, San Jose, CA). Se midió la diferencia de peso tras la desecación y los resultados se expresaron en porcentaje de agua respecto al peso de la muestra.

Para determinar el porcentaje en cenizas (AOAC, 1995) se depositaron 5 gramos de muestra en cápsulas de porcelana previamente taradas. Tras calcinar las muestras en placa calefactora, se introdujeron en un mufla (JP Selecta modelo Select Horn, JP Selecta S.A. Abrera, Barcelona, España) a una temperatura de 500 °C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo las cápsulas, se pesaron y los resultados se expresaron en % de cenizas con respecto al peso de la muestra.

El porcentaje de proteína bruta se midió por el método de combustión de Dumas siguiendo el método oficial de la AOAC, (1995). Se pesaron de 0,5 a 1 gramos de músculo de merluza (balanza Sartorius modelo BP 61S, Sartorius AG, Goettingen, Alemania) y se introdujeron en un analizador automático de nitrógeno calibrado con EDTA al 9,59 %, cuyo funcionamiento está basado en el método Dumas (LECO, modelo FP-2000, LECO Corp., St. Joseph, MI, EE.UU). La muestra se colocó en el cabezal de carga y se purgó de cualquier gas atmosférico que hubiera ingresado en el proceso de preparación de la muestra. Se calentó a 1000 °C. El N₂ es arrastrado por una

corriente de gas helio hacia una celda de conductividad térmica donde se mide la concentración de N₂ presente en la muestra. Los resultados se expresaron en porcentaje de proteína utilizando 6,25 como factor de conversión.

Para determinar el contenido de grasa se utilizó una modificación del método de Bligh & Dyer (1959). Para ello, se homogeneizaron (homogenizador T25 Ultra-Turrax, GMBH & CO KG, Germany) 40 gramos de muestra con una solución de diclorometano: metanol 1:1 (80 ml de metanol y 80 ml de diclorometano). Se añadió agua destilada para favorecer la separación de fases y se dejó reposar toda la noche en una cámara a 0 °C. Se obtuvieron dos fases, una fase orgánica que contiene los lípidos del pescado y una fase acuosa que contiene la fracción no lipídica. Se aisló la fase orgánica y se evaporó el disolvente en un rotavapor (Büchi rotary R-evaporator, Büchi Labortechnik AG, Suiza) a 30-40 °C hasta un volumen final de 10 ml. La cuantificación del extracto lipídico se realizó mediante análisis gravimétrico tomando 2 ml de la fase orgánica y evaporando el disolvente con gas nitrógeno. Los resultados se expresaron como gramos de grasa en 100 gramos de músculo. El resto de la fase orgánica se distribuyó en alícuotas de 2 ml que se congelaron a -80 °C hasta su análisis.

El pH se midió utilizando un Thermo Orion 3star (Thermo Scientific, Environmental Instruments, Beverly, USA) en un homogeneizado 10 gramos de muestra con 100 ml de agua destilada (1:10, p/v) a temperatura ambiente.

En todos los casos se realizaron 6 medidas repetidas por muestra. La materia prima utilizada para realizar los análisis elementales era una mezcla de varios individuos para evitar el posible efecto de la variabilidad entre individuos diferentes.

3.3.- ANÁLISIS PERIÓDICOS

3.3.1.- Capacidad de retención de agua (CRA)

Se determinó de acuerdo con Sánchez-Alonso et al. (2011). Se introdujeron 3 gramos de muestra de la zona dorsal del filete en tubos de centrífuga de 30 mm de diámetro y 50 ml de volumen a los que previamente se les habían introducido dos filtros Whatman de 110 mm de diámetro enrollados a las paredes del tubo. La muestra se centrifugó a 3000 g durante 15 minutos a 20 °C. Se utilizó una centrífuga Heraeus multifuge 3L-R (Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Germany) con un rotor (Bioshield 75006435, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Germany). Tras la centrifugación se pesaron los filtros libres de muestra. El resultado se expresó como el porcentaje de agua retenida por la muestra midiendo el peso de agua perdida tras el proceso de centrifugación. Se realizaron al menos 3 medidas repetidas por individuo.

3.3.2.- Viscosidad aparente

Se realizó siguiendo el método de Borderías et al. (1985) modificado por Barroso et al. (1998b). Se pesaron 50 gramos de merluza descongelada de la zona central del filete, usando una balanza granataria marca Mettler modelo PC 4400 y se añadieron 200 ml de NaCl al 5 % que contenía tampón fosfato 50 mM a pH 7,0. La mezcla se homogenizó a baja temperatura durante un minuto (homogenizador Sorvall Omni-mixer, Ivan Sorvall, Inc, Norwalk, Conn USA). Con el fin de eliminar las burbujas de aire, el homogenizado resultante se centrifugó a 1500 rpm usando una centrífuga marca Beckman modelo J2-MC High Speed Centrifuge (Beckman

Instrument, California, USA) utilizando el rotor JA14 (Beckman Instrument, California USA) a una temperatura de 4 °C durante 8 minutos. El homogenizado se mantuvo en una batea con hielo durante todo el proceso. Se utilizó un viscosímetro (figura 3.3.1 a) (Brookfield DV-III Stoughton, MA) a una velocidad de 12 rpm durante 3 minutos y se usaron los “husillos” número 3 y 4 (figura 3.3.1 b) dependiendo de la viscosidad del homogenizado. Los resultados se expresaron en centipoises (cP) y se realizaron 2 medidas repetidas por individuo.

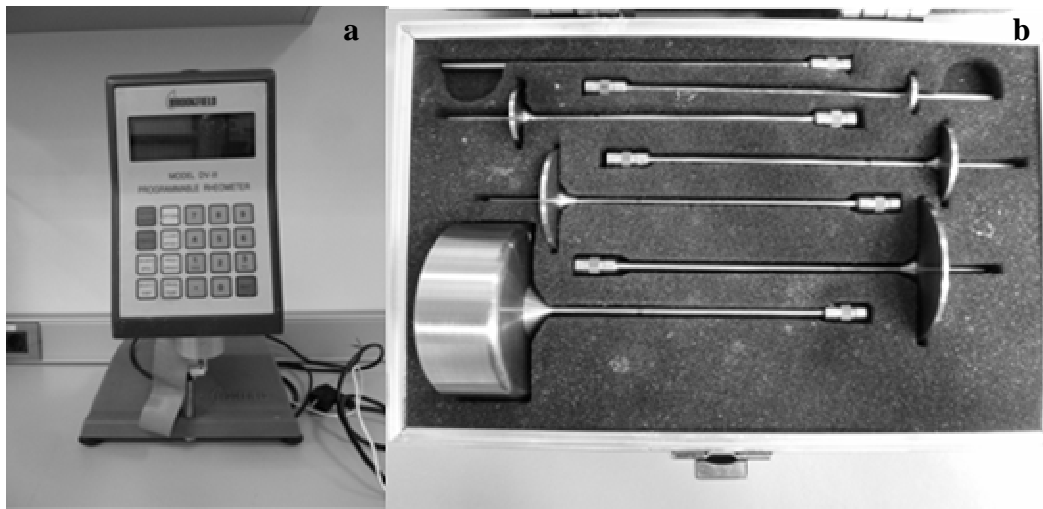


Figura 3.3.1: Imagen de un viscosímetro Brookfield modelo DV-III (a) y de su juego de husillos (b)

3.3.3.- Resistencia a la cizalladura con la célula de Kramer

La resistencia a la cizalladura se determinó según Kramer et al. (1951) con ciertas modificaciones (Sánchez-Alonso et al. 2012). Se cortaron paralelepípedos de la zona dorsal del filete de 5 x 1 x 1 cm (figura 3.3.2 a) previamente atemperados en el caso de muestras congeladas. Estos se pesaron en una balanza granataria, se envolvieron de dos en dos en papel de aluminio y se dejaron descongelar en una batea con hielo

cubierta con papel de aluminio para evitar la entrada de agua a las muestras. Típicamente se conseguían 10 paralelepípedos por filete. Se dispusieron dos paralelepípedos en la célula de Kramer centrados y separados unos milímetros entre sí (figura 3.3.2 b). El análisis instrumental de textura se llevó a cabo mediante una célula HDP/KS5 con 5 cuchillas (figura 3.3.2 c), conectada a un texturómetro TA-XT2i Texture Analyser (Stable Micro Systems, Godalming, Surrey, UK) con una velocidad de cabezal de 2,0 mm/s. Se utilizó una célula de carga de 25 kg. Los resultados se expresaron en fuerza máxima por gramo de muestra (N/g). Se realizaron 5 medidas repetidas por individuo. El software utilizado para el ensayo fue Texture Expert. Stable Micro Systems LTD Versión 1.22.

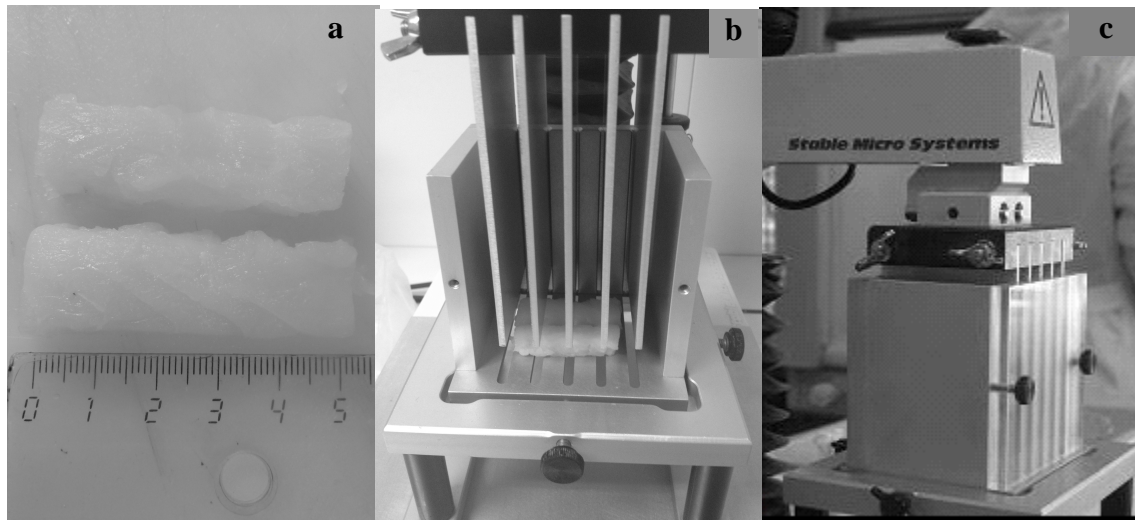


Figura 3.3.2: a: Dimensiones de los paralelepípedos, b: Colocación de los paralelepípedos dentro de la célula de Kramer y c: Célula de Kramer con 5 cuchillas

3.3.4.- Perfil de ésteres metílicos de ácidos grasos por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (FID)

La extracción de grasa se describe en el apartado 3.2. Los ácidos grasos son compuestos que presentan una elevada temperatura de volatilización, por lo que no son susceptibles de ser directamente determinados mediante cromatografía de gases y es necesario proceder a su derivatización con objeto de obtener un compuesto volátil que pueda ser cromatografiado. Así, previamente al proceso cromatográfico los lípidos extraídos se derivatizan para obtener los ésteres metílicos de cada uno de los ácidos grasos. En la presente tesis se realizaron dos tipos de metilaciones, en medios ácido y básico respectivamente.

Derivatización ácida de la muestra.- Se añadió 1 ml de patrón interno (C13:0, 1 mg/ml en heptano) a 0,01-0,02 g de lípidos de merluza, se homogeneizaron con 2 ml de una solución de metóxido de sodio 0,5 M en metanol durante 1 minuto en un vórtex y se incubaron 15 min a 50 °C. A continuación, se añadieron 2 ml de una solución de cloruro de acetilo en metanol (1:10 v/v), se homogenizó 1 minuto en un vórtex y se incubaron 60 minutos a 60 °C. Tras dejar enfriar las muestras a temperatura ambiente, se añadió 1 ml de agua desionizada, 3 ml de heptano y aproximadamente 1 g de Na₂SO₄. Finalmente, los tubos se agitaron en vórtex durante 1 minuto, se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 rpm a 4 °C, y el sobrenadante se transfirió a tubos nuevos.

Derivatización básica de la muestra.- Se añadió 1 ml de patrón interno (C13:0, 1 mg/ml en heptano) a 0,01-0,02 g de lípidos de merluza, se homogeneizaron con 2 ml de

una solución de metóxido de sodio 0,5 M en metanol durante 1 minuto en un vórtex y se incubaron 15 minutos a 50 °C. A continuación, se añadió 1 ml de agua desionizada, 3 ml de heptano y aproximadamente 1 g de Na₂SO₄. Los tubos se agitaron en un vórtex durante 1 minuto y se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 rpm a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a tubos nuevos.

Separación cromatográfica.- Cromatografía de gases con detector de ionización de llama.- Los ésteres metílicos de ácidos grasos se analizaron en un cromatógrafo 7820A (Agilent Technologies) equipado con un detector de ionización de llama y una columna capilar de sílice fundida (HP-88, 60 m x 250 µm x 0,2 mm, Agilent Technologies). La rampa de temperatura se programó de 125 °C a 220 °C, de tal manera que aumentó primero a 8 °C/minuto hasta 145 °C donde se mantuvo durante 26 minutos y posteriormente a 2 °C/minuto hasta 220 °C donde se mantuvo durante 5 minutos. Se utilizó helio como gas portador a 1,5 ml /minuto. Los flujos en el detector fueron de 40 ml/minuto de hidrógeno y 450 ml/minuto de aire. Las temperaturas del inyector y detector fueron 250 y 260 °C, respectivamente. La división de flujo fue de 40:1 y el volumen de inyección fue de 0,5 µL. Se identificaron veintidós ácidos grasos por comparación de sus tiempos de retención con los de mezclas estándar (Ref 47563 Supleco y PUFA N°2 de origen animal Ref 47015-U, Sigma). Los resultados se expresaron como porcentaje de éster metílico de ácido graso (FAME) o grupos de ésteres metílicos respecto al total de FAME identificados en el análisis. También se expresaron en miligramos de FAME/g grasa total y como µmoles de FAME/g grasa total.

3.3.5.- Relaxometría ^1H RMN de bajo campo

Se cortaron paralelepípedos de 1 x 1 x 2 cm excepto en el experimento B en el que éstos fueron de 1 x 1 x 3 cm. Para el experimento A se cortaron 24 paralelepípedos (3 por cada tiempo de análisis), y se anotó la hora a la que se había realizado cada uno de ellos. Después se introdujeron en tubos de vidrio (figura 3.3.3 a) de 1,8 cm de diámetro y una altura de 18 cm (modelo mq-Tub 18, Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Alemania). Dichos tubos se depositaron en gradillas en un baño de agua (Thermo Scientific / Haake DC 10-K10, Fisher Scientific, Madrid, España) a la temperatura de preparación objeto de estudio (variable en el experimento A y 4 °C durante al menos 60 minutos en el resto de los experimentos. En todos los casos, se comprobó la temperatura de cada paralelepípedo, antes y después del análisis con un termómetro digital VWR, EU-620-0916 NA 82020-744 (VWR International GMBH Viena, Austria).

El análisis de relaxometría se realizó en un analizador ^1H RMN de bajo campo Bruker minispec mq 20 (Bruker Optik GMBH, Alemania) con una intensidad de campo magnético de 0,47 T, correspondiente a una frecuencia de resonancia de protones de 20 MHz (figura 3.3.3 b). El instrumento, salvo en el experimento B, estaba equipado con una sonda de temperatura variable PA 225 PH H20/18/25/BA/V 18 (Bruker Optik GMBH, Ettlingen, Alemania). La temperatura de la muestra en la sonda de RMN se reguló a 4 °C con un baño de agua termostatzado (Thermo Scientific / Haake DC 10-K10, Fisher Scientific, Madrid, España). Los tiempos de relajación se midieron utilizando la secuencia de Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) (Carr & Purcell, 1954; Meiboom & Gill, 1958). Las determinaciones de T_2 se realizaron con un tiempo de espera (τ) de 150 μs , 16 scans o repeticiones y 3000 ecos. El tiempo de repetición entre

dos scans subsiguientes se ajustó a 2 segundos. Se realizaron al menos tres medidas repetidas por individuo provenientes de 3 paralelepípedos.

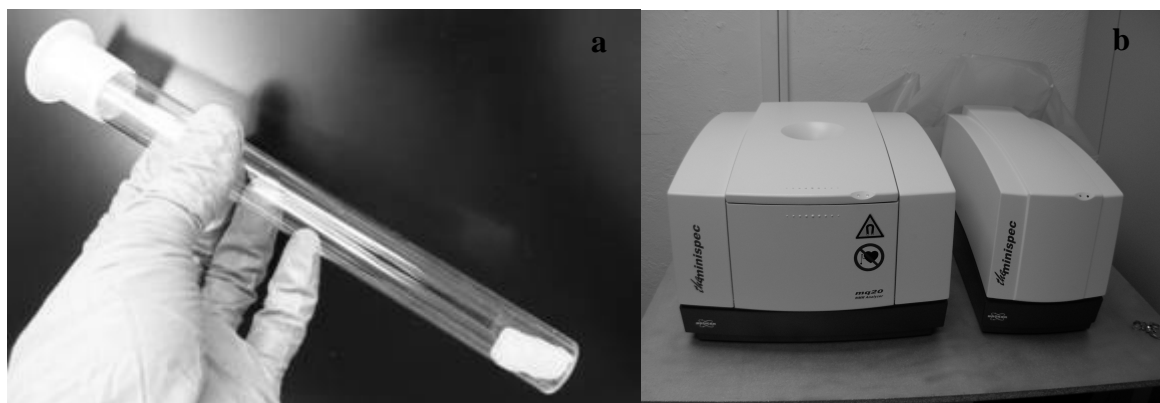


Figura 3.3.3: a: Tubo de RMN y el paralelepípedo en su interior y b: Analizador ^1H RMN de bajo campo

3.4.- ANÁLISIS DE DATOS

3.4.1.- Análisis de los datos de relaxometría ^1H RMN de bajo campo

La señal RMN de bajo campo se analizó mediante la resolución de las ecuaciones multiexponenciales de T_2 propuestas por Bloch et al. (1946) y por medio del análisis CONTIN, resolviendo la inversa de la transformada de Laplace.

Análisis de ajuste por biexponenciales.- En este tipo de análisis se resuelve la ecuación exponencial propuesta por Bloch et al. (1946) para la relajación transversal. Según Bloch $M_{xy} = M_0 e^{-t/T_2}$, fórmula que considera una sola exponencial. Como ya se mencionó en la introducción los tiempos de relajación T_2 medidos en los sistemas alimentarios pueden ser multiexponenciales por los intercambios lentos por difusión que suceden entre los distintos compartimentos del agua (Belton, 2011). Si se supone un sistema de señales multiexponenciales, la ecuación de Bloch se podría escribir como:

$$M_{xy} = M_{01} e^{-t/T_{21}} + M_{02} e^{-t/T_{22}} + \dots + M_{0n} e^{-t/T_{2n}}.$$

Donde M_{xy} corresponde al componente de magnetización transversal a lo largo del eje xy ; M_{0i} es el componente de magnetización del protón i ; t es el tiempo transcurrido y T_2 corresponde al tiempo de relajación transversal. De este modo y como ya se ha visto en la introducción, se considera que M_{xy} es la suma de todos los momentos magnéticos (M_{0i}) en la componente xy . Como cada momento magnético detectado se refiere a un espín diferente, y por tanto a protones diferentes, se deben producir cambios en la señal, que pueden ser detectados por el análisis de la relaxometría ^1H RMN de bajo campo.

Estos cambios son detectados por variaciones en las amplitudes de dicha señal. Así aplicando la ecuación de Bloch en formato de amplitudes en vez de vectores se obtiene la siguiente ecuación:

$$S(t) = A_{21} e^{-t/T_{21}} + A_{22} e^{-t/T_{22}} + \dots + A_{2n} e^{-t/T_{2n}}$$

Donde S es la señal del RMN, T_{21} y $T_{22} \dots T_{2n}$ son los tiempos de relajación transversal, A_{21} y $A_{22} \dots A_{2n}$ son las amplitudes de los tiempos de relajación y t es el tiempo. Las ecuaciones que se estudiaron en esta Tesis son biexponenciales y se utilizó el software adquirido con el equipo (Bruker-the minispec versión 1.2).

Análisis CONTIN.- El análisis CONTIN, es una utilidad informática para invertir el ruido que produce la interpretación de los datos en algebraica lineal y ecuaciones integrales por medio de la transformada inversa de Laplace (ILT) (Provencher, 1982 a, b). La ILT es una conversión en la que existen un gran número de posibles soluciones. El análisis CONTIN es un algoritmo regularizado por mínimos cuadrados para imponer una cierta claridad en los datos, encontrando la solución más simple (Provencher, 1982, b). La suma de forma cuadrática (mínimos cuadrados) es un regulador para la ILT que impone una uniformidad al problema planteado con una comprensión estadística previa (Provencher, 1982a; Provencher, 1982b). El algoritmo que se realiza con el análisis CONTIN da la solución más adecuada según la programación del método y aunque esta solución tan sólo es una de las posibilidades, esta limitación es inevitable (Aursand, 2009). Para resolver el algoritmo CONTIN, se debe partir de la ecuación multiexponencial y realizar la siguiente operación:

$$F(s) = \int_0^{\infty} S(t) e^{-st} dt.$$

Donde $F(s)$, es el algoritmo CONTIN, S es la señal RMN y t el tiempo. La resolución del algoritmo por tanto, busca que $F(s)$ se puede ajustar a un $S(t)$ ya registrado mediante las ecuaciones multiexponenciales (Aursand, 2009). Para este análisis se ha usado el software adquirido con el equipo (CONTIN - the minispec - v 1.2).

Se ha observado que los resultados del análisis CONTIN revelan la frecuencia de distribución de los tiempos de relajación de los protones existentes en un determinado medio (figura 3.4.1).

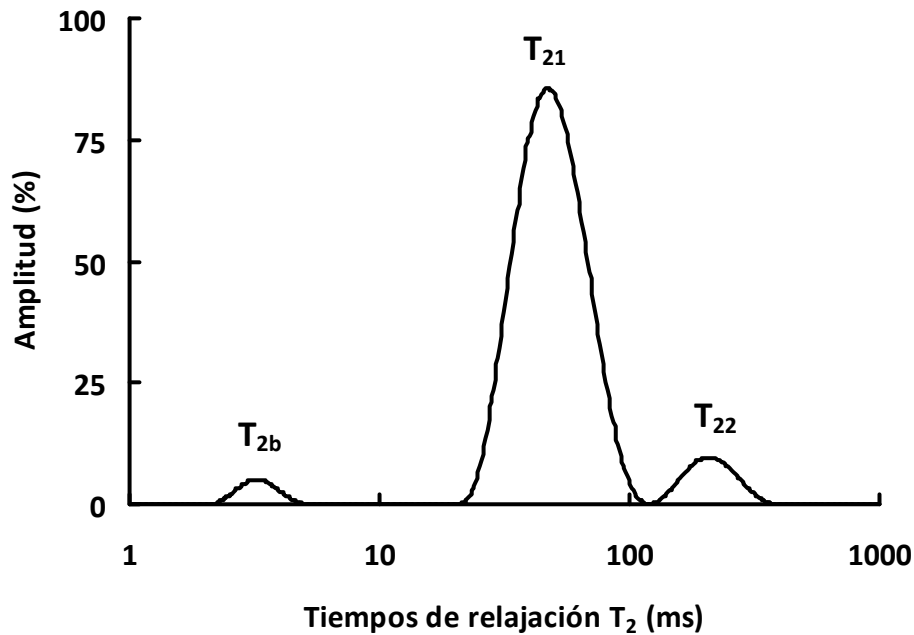


Figura 3.4.1: Distribución de los tiempos de relajación en el músculo

Los datos de los parámetros espectroscópicos fueron normalizados cuando fue necesario. Los datos X-Y de las curvas descritas por T_2 se normalizaron dividiendo cada amplitud de la señal entre la máxima amplitud obtenida.

3.4.2.- Análisis estadístico

En los análisis de elementales y análisis periódicos se hallaron las medias y las desviaciones estándar de las medidas repetidas por individuo. Se realizaron análisis de la varianza cuando fue necesario en función de los factores estudiados en cada experimento. También se realizaron estudios de correlación entre los parámetros físico-químicos y los parámetros espectroscópicos.

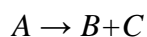
Se realizaron análisis de regresión lineal simple de los parámetros biexponenciales con respecto al tiempo de conservación, y de regresión por mínimos cuadrados parciales, con el tiempo de conservación como variable dependiente y los espectros del análisis CONTIN como variables independientes.

Los análisis por componentes principales (PC) se efectuaron en: a) los parámetros obtenidos mediante el análisis biexponencial (A_{21} , T_{21} , A_{22} y T_{22}), b) utilizando los datos normalizados de las curvas descritas por T_2 y c) los datos normalizados resultado del análisis CONTIN. Los análisis por componentes principales b) y c), se realizaron en un rango de estudio entre los 12 y los 700 ms. Los programas usados fueron SPSS (IBM SPSS statistics version 20, IBM Corporation, 2011 N.Y.) y Unscrambler v 9.6 (CAMO Software AS, Oslo, Norway).

3.4.3.- Modelización cinética

Como ya se ha comentado, la modelización matemática puede ser muy ventajosa para estudiar la calidad y la vida útil de un alimento. Esta modelización tiene sus bases en la teoría de la cinética química, la cual se pasará a resumir a continuación.

En base a la literatura consultada, para el estudio de la cinética de los alimentos Taoukis et al. (1997) y Van Boekel (2008), para una reacción de la forma:



La velocidad de desaparición del reactivo A se puede definir con la siguiente ecuación:

$$r = -dA/dt = kA^n \quad (\text{ec. 1})$$

También se pueden definir las velocidades de aparición de los productos:

$$r = dB/dt = kB^n \quad (\text{ec. 2})$$

$$r = dC/dt = kC^n \quad (\text{ec. 3})$$

Donde r indica la velocidad de la reacción, A indica el factor que se modifica, t el tiempo, k es la constante de velocidad y n indica el orden de la reacción. Si se resuelven estas ecuaciones diferenciales, se obtienen las denominadas ecuaciones de velocidad. Por ejemplo la ecuación de los reactivos es como sigue:

Si la ecuación es de orden cero, es decir $n=0$

$$A = A_0 - kt \quad (\text{ec. 4})$$

y si la ecuación es de orden 1:

$$A = A_0 \exp(-kt) \quad (\text{ec. 5})$$

Donde A_0 es el valor de la variable respuesta a tiempo cero, A es el valor de la variable

respuesta a tiempo t y k es la constante de velocidad.

Durante el desarrollo de esta Tesis, se consideró usar el modelo denominado de conversión fraccional (Gonçalves et al. 2011; Martins & Silva, 2003). El modelo está representado en la ecuación 6.

$$A = A_{eq} + A_I \exp(-kt) \quad (\text{ec. 6})$$

Donde A es la variable respuesta a tiempo t , A_{eq} es el valor residual y A_I es la diferencia entre el valor inicial y el valor residual.

A efectos prácticos, y en los resultados de esta Tesis, para hallar el orden de la reacción, se expresaron gráficamente los resultados del parámetro objeto de estudio a lo largo del tiempo de conservación medido en semanas, después se realizaron estudios de regresión y se vio mediante el mejor coeficiente de determinación (R^2) qué modelo de regresión se adecuaba más a los resultados obtenidos. Sin embargo hay veces que puede haber errores a la hora de elegir cual puede ser el orden de la reacción y por esto es aconsejable que la tasa de cambio haya superado el 50 % (Taoukis et al. 1997).

La ecuación de Arrhenius se puede formular como: $k = k_A \exp(-E_a/RT)$ (ec. 7). Esta ecuación, relaciona la velocidad de reacción específica (k) con la temperatura absoluta (T), donde R , corresponde a la constante universal de gases, k_A corresponde al factor preexponencial y E_a corresponde a la energía de activación (Taoukis et al. 1997; Van Boekel, 2008). La velocidad de reacción (k), a efectos prácticos es la pendiente de la recta que se obtiene al realizar la regresión explicada anteriormente para hallar el orden de la reacción. De este modo, la E_a y k_A pueden ser calculadas si se representa gráficamente el $\ln k$ frente a $1/T$. Así la E_a se calcula por medio de la pendiente de la

recta resultante y k_0 corresponde a la ordenada en el origen (Taoukis et al. 1997; Van Boekel, 2008). Este tipo de cálculo se denomina cálculo en 2 pasos, y ya que a veces puede dar predicciones imprecisas, se utilizan los cálculos en un solo paso, que se basa en unificar la ecuación de velocidad y la ecuación de Arrhenius. Estos cálculos incrementan los grados de libertad y realizan una estimación más precisa de los parámetros (Taoukis et al. 1997; Van Boekel, 2008). Para ello se sustituye en las ecuaciones de velocidad, la constante de velocidad (k) por su valor de la ecuación de Arrhenius, dando como resultado las ecuaciones que se muestran a continuación.

Si la cinética es de orden 0:

$$A = A_0 - k_A t \exp(-Ea/RT) \quad (\text{ec. 8})$$

Si la cinética es de orden 1:

$$A = A_0 \exp[-k_A t \exp(-Ea/RT)] \quad (\text{ec. 9})$$

Si la cinética corresponde a un modelo de conversión fraccional:

$$A = A_{eq} + A_I \exp[-k_A t \exp(-Ea/RT)] \quad (\text{ec. 10})$$

Para hallar los parámetros de estos modelos y realizar el cálculo en un paso se utiliza una regresión matemática no lineal. Se utilizó un programa informático de regresión no lineal (algoritmo de Levenberg-Marquardt) utilizando como software el SPSS (IBM SPSS statistics versión 20, IBM Corporation, 2011).

En los resultados expuestos en esta Tesis se han realizado dos modificaciones a las ecuaciones generalmente utilizadas para hallar los modelos cinéticos. Por un lado, se

ha propuesto que cuando los análisis realizados no tienen un significado físico, se pueden simplificar las ecuaciones sustituyendo “ $-Ea/R$ ”, por un nuevo factor denominado B (Van Boekel, 2008). De esta forma, por ejemplo la ecuación para hallar los parámetros cinéticos en un solo paso de una reacción de orden cero sería:

$$A = A_0 - k_A t \exp(-B/T) \quad (\text{ec. 11})$$

La ecuación para hallar los parámetros cinéticos en un solo paso de una reacción de orden uno sería:

$$A = A_0 \exp[-k_A t \exp(-B/T)] \quad (\text{ec. 12})$$

La ecuación para hallar los parámetros cinéticos en un solo paso de un modelo de conversión fraccional tendrá la expresión:

$$A = A_{eq} + A_1 \exp[-k_A t \exp(-B/T)] \quad (\text{ec. 13})$$

Por otro lado, hay ocasiones en las que a la hora de hallar los parámetros cinéticos existen unos errores muy altos desde el punto de vista estadístico y es aconsejable escoger una temperatura de referencia, generalmente una temperatura intermedia a las temperaturas utilizadas (Van Boekel, 2008). De este modo se asume que k_A y la Ea no dependen de la temperatura en el intervalo propuesto. Así por ejemplo la ecuación para hallar los parámetros cinéticos en un solo paso de una reacción de orden cero sería:

$$A = A_0 - k_{ref} t \exp[-B(1/T - 1/T_{ref})] \quad (\text{ec. 14})$$

La ecuación para hallar los parámetros cinéticos en un solo paso de una reacción de

orden uno sería:

$$A = A_0 \exp [-k_{ref} t \exp (-B(1/T-1/T_{ref}))] \quad (\text{ec.15})$$

La ecuación para hallar los parámetros cinéticos en un solo paso de un modelo de conversión fraccional sería:

$$A = A_{eq} + A_1 \exp [-k_{ref} t \exp (-B(1/T-1/T_{ref}))] \quad (\text{ec. 16})$$

Donde T_{ref} es la temperatura de referencia y k_{ref} corresponde a la velocidad constante a esa temperatura. En los modelos cinéticos utilizados en esta Tesis se optó por tomar una temperatura de referencia de $-20\text{ }^{\circ}\text{C} = 253\text{ K}$. Esta temperatura se escogió por ser una temperatura intermedia a las temperaturas utilizadas en el experimento que además se acerca al máximo de la temperatura de conservación recomendada ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$).

El análisis mediante los modelos cinéticos se realizó a partir de los resultados del tercer experimento. Se analizaron las cinéticas de la pérdida de CRA, del aumento de la resistencia a la cizalladura y aparición de ácidos grasos libres. También se realizaron modelos cinéticos con los datos resultantes del análisis por relaxometría ^1H RMN de bajo campo. Para el desarrollo de estos últimos modelos cinéticos y como ya se había propuesto previamente para otras espectroscopías (Careche et al. 2015) se utilizaron las puntuaciones del análisis por componentes principales realizado en el análisis CONTIN y en el análisis de las curvas descritas por T_2 (ver apartado 3.5.2.). Además hay que mencionar que en los análisis de modelización cinética utilizando los datos del análisis CONTIN, se realizaron modelos en diferentes rangos de la señal (entre 12 y 700 ms)

con el fin de obtener el modelo más ajustado, con mejores R^2 y con menores errores estándar.

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- EFECTO DE LAS CONDICIONES DE ANÁLISIS EN LA RELAXOMETRÍA ^1H RMN DE BAJO CAMPO

En este trabajo se han seguido las condiciones de análisis de relaxometría propuestas por otros autores (Aursand et al. 2008) en cuanto a geometría de las muestras y condiciones iniciales para obtener la secuencia CPMG en el analizador ^1H RMN de bajo campo. Para abordar el objetivo 1 de esta Tesis y optimizar las condiciones de ensayo, se realizaron los análisis conforme al experimento A, detallado en el apartado de material y métodos (figura 3.1.1). Así, se estudió fundamentalmente el efecto del tiempo y temperatura de preparación de la muestra, pero también se abordó la variabilidad inter día y la interacción entre el efecto del tiempo y temperatura de preparación y calidad de la muestra. Las curvas de relajación se estudiaron por medio del ajuste de biexponenciales y la función de distribución CONTIN.

4.1.1.- Efecto de la temperatura y tiempo durante la preparación de la muestra

En la mayor parte de los experimentos realizados se ha utilizado pescado conservado en estado congelado. Tras la preparación de los paralelepípedos, que se realizaba en pescado semidescongelado, el tiempo transcurrido hasta alcanzar la temperatura de preparación (figura 4.1.1) fue, como era de esperar, mayor a temperaturas más bajas, de tal forma que se requerían 140 min para alcanzar 2 °C, 80 min para 4 °C, mientras que a partir de 60 min se alcanzaban los 6 o 10 °C. La velocidad en $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ para cada temperatura fue de 0,019 (2 °C); 0,055 (4 °C); 0,106 (6 °C) y 0,167 (10 °C).

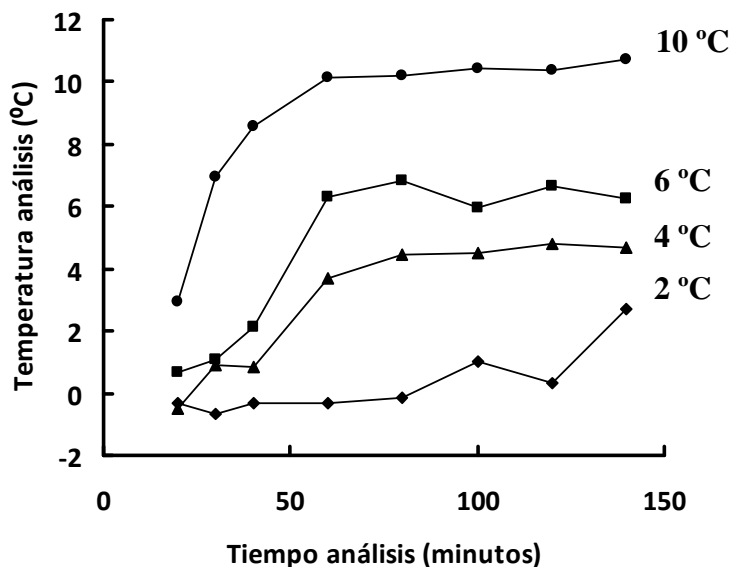


Figura 4.1.1: Tiempo necesario para alcanzar la temperatura de análisis fijada a 2 (◆), 4 (▲), 6 (■), y 10 °C (●). Cada temperatura de análisis representa la media de dos ensayos realizados por temperatura de descongelación

Una de las cuestiones analizadas fue si la temperatura de preparación de la muestra afectaba a la señal de RMN. Para ello se realizaron una serie de experimentos con distintos lotes de filetes de merluza que habían estado congelados a -70 °C durante 4 días y posteriormente conservados a -20 °C entre 4 y 29 días. Una vez alcanzada la temperatura diana, se efectuaron medidas sucesivas hasta un tiempo de 140 minutos. La figura 4.1.2 muestra los valores obtenidos en el análisis de ajuste por biexponenciales de estas determinaciones para 8 días independientes de análisis. Este ajuste proporciona dos tiempos de relajación con sus correspondientes coeficientes o amplitudes relativas, uno cercano a los 50 ms y otro que está en el rango entre 150 y 300 ms. En miosistemas, si se utiliza el ajuste por biexponenciales, el primer tiempo de relajación detectado denomina T_{21} y corresponde a protones con movilidad intermedia y el segundo se denomina T_{22} y corresponde a protones con alta movilidad (Aursand et al. 2008;

Bertram et al. 2001; Sánchez-Alonso et al. 2014). La descripción del origen e interpretación de las señales resultantes se realizará en los capítulos 4.2 y 4.5. Se observa que los resultados son bastante estables en función de la temperatura de preparación de la muestra. Se comprobó que no existían diferencias significativas en los parámetros espectroscópicos en función del tiempo de preparación ($p>0,05$). Los resultados más estables en relación a la temperatura de análisis se obtuvieron en los parámetros T_{21} existiendo mayor heterogeneidad en los valores de T_{22} especialmente cuando se efectuó la medida a 10 °C.

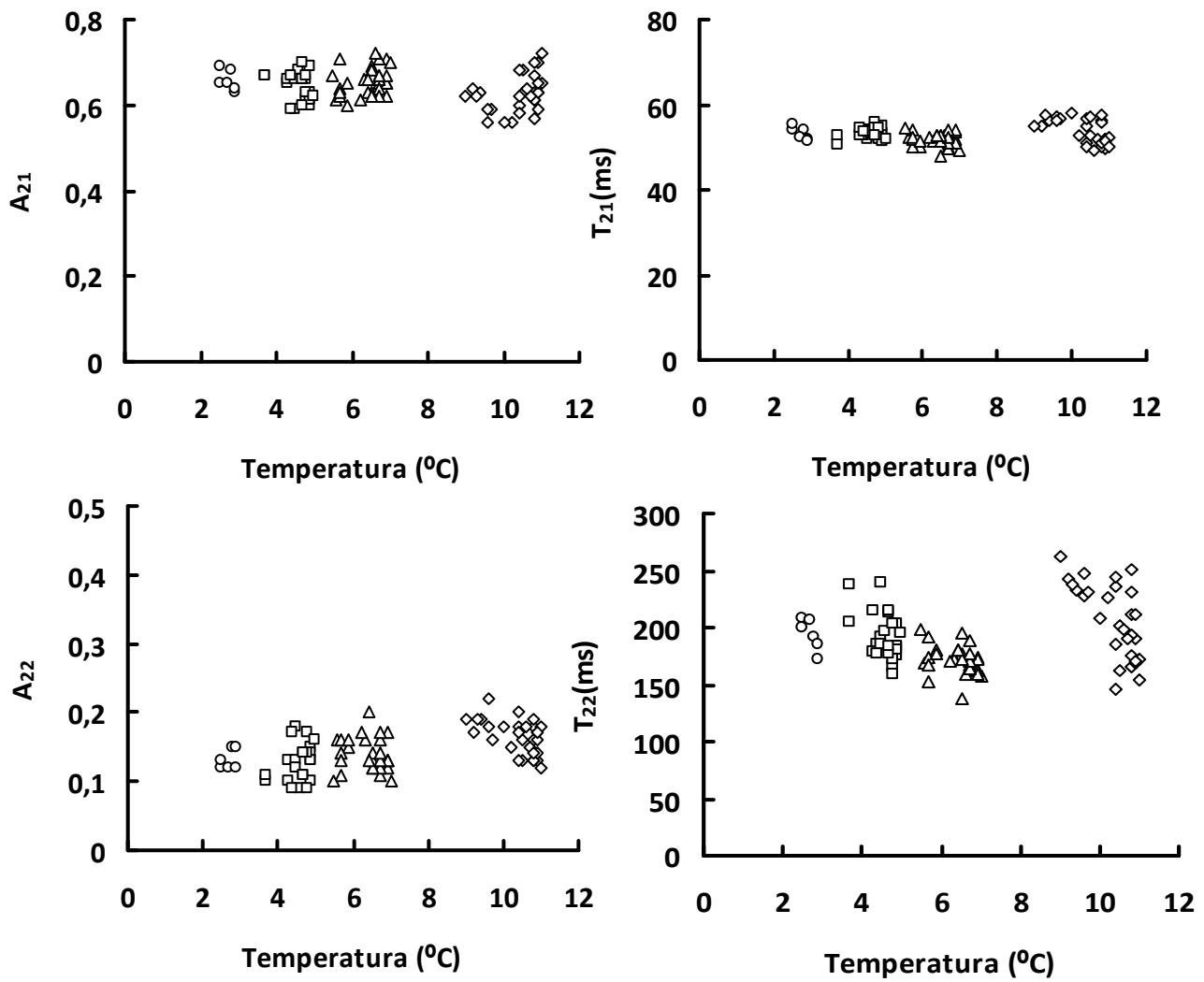


Figura 4.1.2: Efecto de la temperatura de preparación de la muestra (2 °C (○), 4 °C (□), 6 °C (Δ) y 10 °C (◇)) en los parámetros biexponenciales de merluza conservada en congelación a -70 °C durante 4 días y a -20 °C entre 4 y 29 días. Cada punto representa una medida de cada parámetro biexponencial en un tiempo de análisis determinado (60, 80, 100, 120 ó 140 minutos) a las temperaturas en el momento de efectuar el ensayo

Las figuras 4.1.3 a 4.1.6 muestran los resultados obtenidos mediante el análisis CONTIN a las distintas temperaturas y tiempos de preparación de muestra. En los perfiles se detectaron los tiempos de relajación habitualmente denominados T_{2b} , T_{21} , T_{22} , T_{23} , de acuerdo con estudios realizados en músculo de esta especie (Sánchez-Alonso et al. 2014). Al igual que en el análisis por biexponenciales, mediante el análisis CONTIN se observó que los valores T_{21} no se modificaron con el tiempo de preparación de la muestra. En los tiempos de relajación T_{22} existió más heterogeneidad en los perfiles también por este método de análisis de las curvas de relajación.

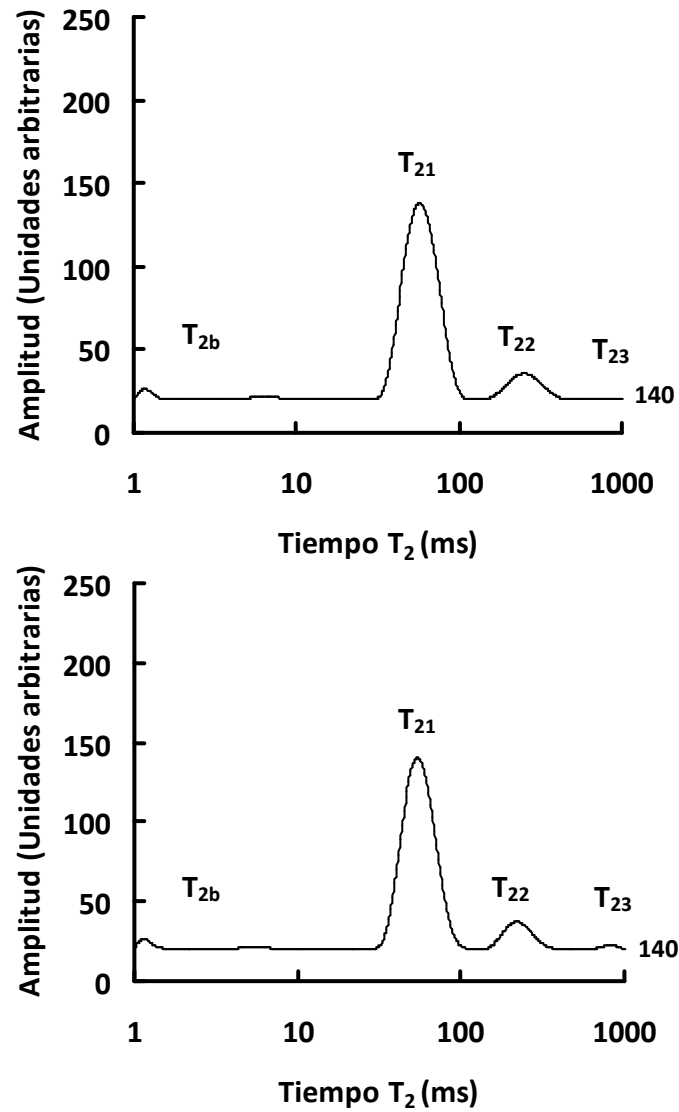


Figura 4.1.3: Distribución de los tiempos de relajación mediante el análisis CONTIN del músculo de merluza analizado a 2 °C en dos experimentos independientes. El tiempo transcurrido hasta alcanzar la temperatura fue de 140 minutos. Cada perfil representa la media de 3 medidas repetidas por tiempo de análisis. Los números de la derecha indican los tiempos de análisis medidos en minutos

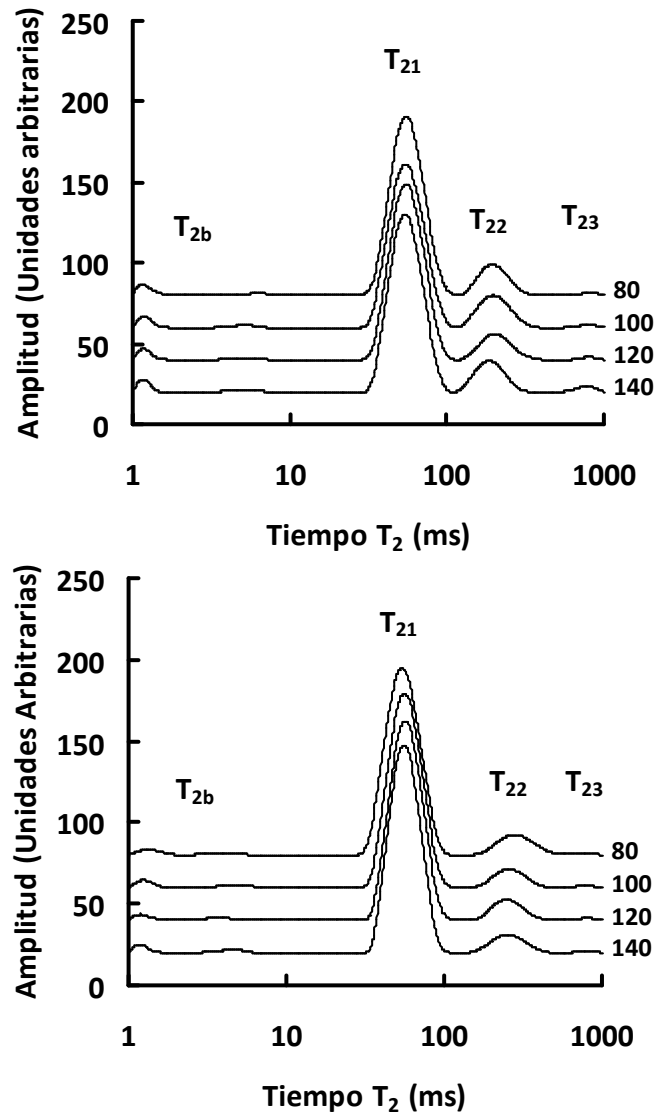


Figura 4.1.4: Distribución de los tiempos de relajación mediante el análisis CONTIN del músculo de merluza analizado a 4 °C en dos experimentos independientes. El tiempo transcurrido hasta alcanzar la temperatura fue de 80 minutos. Se analizaron muestras hasta un tiempo final de 140 minutos. Cada perfil representa la media de 3 medidas repetidas por tiempo de análisis. Los números de la derecha indican los tiempos de análisis medidos en minutos

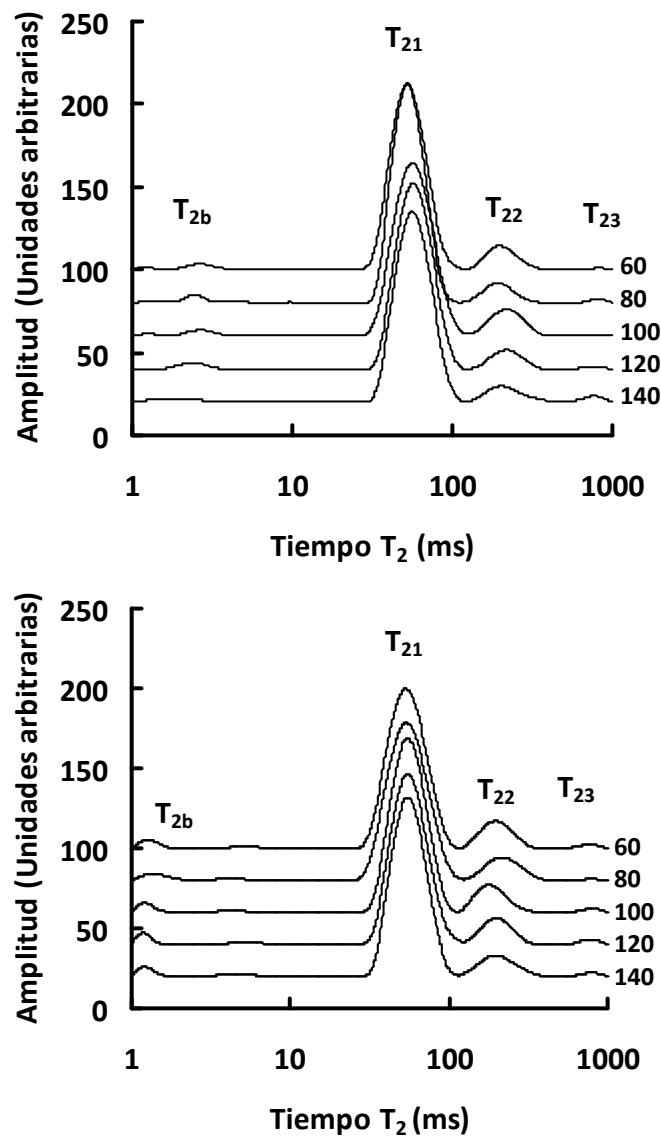


Figura 4.1.5: Distribución de los tiempos de relajación mediante el análisis CONTIN del músculo de merluza analizado a 6 °C en dos experimentos independientes. El tiempo transcurrido hasta alcanzar la temperatura fue de 60 minutos. Se analizaron muestras hasta un tiempo final de 140 minutos. Cada perfil representa la media de 3 medidas repetidas por tiempo de análisis. Los números de la derecha indican los tiempos de análisis medidos en minutos

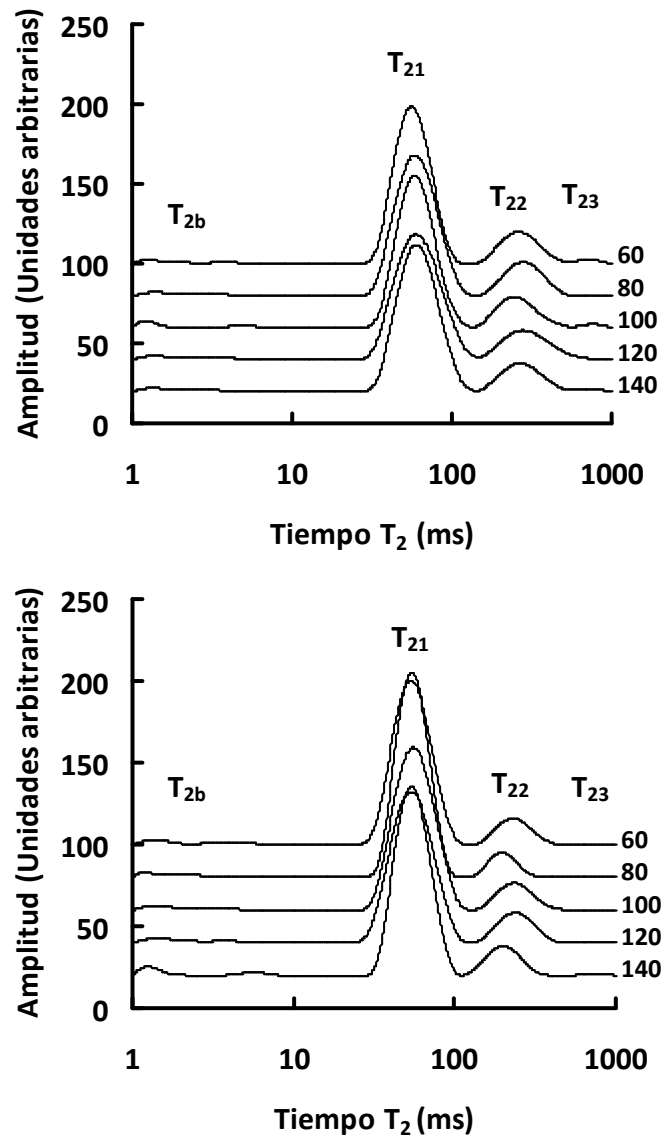


Figura 4.1.6: Distribución de los tiempos de relajación mediante el análisis CONTIN del músculo de merluza analizado a 10 °C en dos experimentos independientes. El tiempo transcurrido hasta alcanzar la temperatura fue de 60 minutos. Se analizaron muestras hasta un tiempo final de 140 minutos. Cada perfil representa la media de 3 medidas repetidas por tiempo de análisis. Los números de la derecha indican los tiempos de análisis medidos en minutos

La figura 4.1.7 refleja los perfiles CONTIN al alcanzar la temperatura diana (a los 140 min para 2 °C, 80 min a 4 °C, y 60 a 6 y 10 °C). Se observaron resultados similares en las bandas T_{21} con independencia de la temperatura y del tiempo requerido para alcanzar cada temperatura. Sin embargo en las bandas correspondientes al tiempo de relajación T_{22} siguió observándose heterogeneidad.

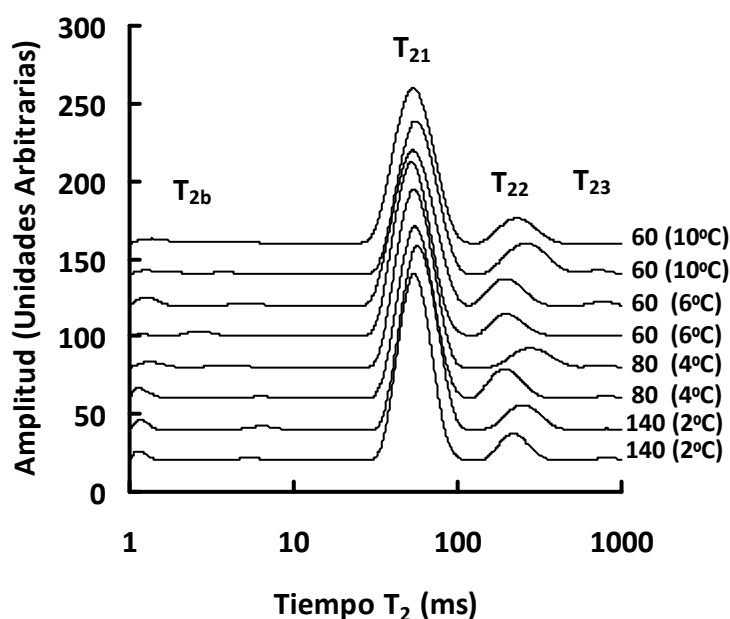


Figura 4.1.7: Distribución de los tiempos de relajación mediante el análisis CONTIN del músculo de merluza analizado a las diferentes temperaturas mostrando el primer tiempo (minutos) en el que se alcanzó la temperatura de análisis. Cada perfil representa la media de 3 medidas repetidas por tiempo de análisis. Los números de la derecha indican el mínimo tiempo transcurrido (minutos) en alcanzar cada temperatura deseada (°C)

Los resultados obtenidos tanto en el análisis CONTIN como en el análisis biexponencial sugieren que es posible operar en un rango de tiempos y temperaturas de preparación de la muestra amplio sin afectar al resultado final. Los resultados también indicaron que existió más variabilidad cerca de 10 °C por lo que se procedió a realizar las operaciones por debajo de esta temperatura.

Para corroborar estos puntos, se realizó un análisis por componentes principales de los perfiles CONTIN de muestras analizadas en dos experimentos de 50 a 700 ms utilizando tres temperaturas (2, 4, y 6 °C) y cinco tiempos (60, 80, 100, 120 y 140 minutos) y mostró que se requirieron 6 componentes para explicar el 96 % de la varianza. La tabla 4.1.1 refleja el porcentaje de varianza explicada; los pesos de los dos primeros componentes principales en este rango se representaron en la figura 4.1.8. El análisis por componentes principales se efectuó también en distintos rangos de la función de distribución de T_2 : 50 a 100 ms (T_{21}) y de 100 a 250 (T_{22}), y de 250 a 700 ms (T_{23}) y se requirieron respectivamente 2, 3 y 3 PC para explicar el 97, 96 y 97% de la varianza (tabla 4.1.1). Se tomó el PC1 por contener mayor porcentaje de varianza explicada y se realizó un análisis de la varianza en función de temperatura y tiempo de análisis y no se observaron diferencias significativas en función estos factores ($p>0,05$).

Tabla 4.1.1: Varianza total explicada (% acumulado) del análisis de componentes principales obtenido mediante los datos del análisis CONTIN en diferentes rangos (milisegundos) en filetes de merluza descongelados

Componentes	Varianza explicada acumulada (%)			
	50-700 ms	50-100 ms	100-250 ms	250-700 ms
1	43	54	59	57
2	63	97	80	90
3	77	100	96	97
4	88	-	99	99
5	93	-	100	100
6	96	-	-	-
7	98	-	-	-
8	99	-	-	-
9	100	-	-	-

PCA a 3 temperaturas diferentes (2,4 y 6 °C) y a 5 tiempos distintos (80, 60, 100, 120 y 140 minutos)

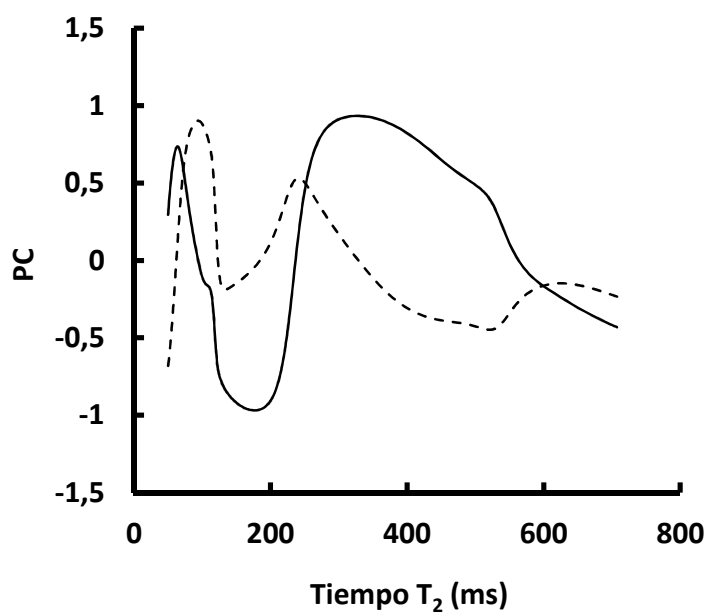


Figura 4.1.8: Análisis por componentes principales de los datos de relaxometría mediante el análisis CONTIN en el rango entre 50 y 700 ms de filetes de merluza descongelados a 3 temperaturas diferentes y a 5 tiempos distintos. La figura muestra los pesos de PC1 y PC2 frente al tiempo de relajación medido en ms. La línea continua describe el peso del PC1 y la línea discontinua el peso del PC2

4.1.2.- Efecto de la temperatura y tiempo durante el proceso de descongelación

El tiempo de relajación del agua en estado sólido es del orden de microsegundos y el del agua líquida, tres órdenes de magnitud superior (Belton, 2011). Una de las consecuencias es que la cantidad de agua líquida se puede determinar fácilmente y se ha estudiado la relación de la señal de ^1H RMN de bajo campo en músculo de salmón con el porcentaje de hielo en la muestra determinado por calorimetría diferencial de barrido. Se ha sugerido que la relación entre la proporción de hielo y las amplitudes de las curvas de relajación pueden utilizarse para calcular la fracción de hielo en filetes conservados por el método denominado “superchilling” (Erikson et al. 2012). Este hecho por lo tanto puede afectar a la señal RMN si la descongelación no es completa en alguna zona del músculo. La figura 4.1.9 muestra un ejemplo representativo de los cambios en la función de distribución durante la descongelación de la muestra a 2 °C. Se observa cómo a temperaturas donde está aún ocurriendo la fusión de los cristales de hielo la banda T_{21} se ensancha y la banda T_{22} es muy pequeña. A medida que la muestra se va descongelando se observa un estrechamiento y un desplazamiento de la banda T_{21} a valores de movilidad más alta y un incremento en su amplitud máxima. La banda correspondiente al tiempo de relajación T_{22} va también estrechándose gradualmente y aumentando en intensidad. Los perfiles no presentaron modificaciones aparentes en las determinaciones realizadas cuando la temperatura en el interior de la muestra fue superior a 0 °C.

Esta ausencia de modificaciones una vez descongelada la muestra se ratificó en experimentos posteriores a 0 y 2 °C (figura 4.1.10). La banda T_{21} se mantuvo entre los 50 y los 100 ms en todo momento, sin observarse ensanchamientos o desplazamientos a

lo largo del tiempo de preparación. Así el máximo de esta banda estuvo en $50,02 \pm 0,93$ ms y su abundancia relativa en tanto por uno fue de $0,83 \pm 0,04$ en el experimento realizado a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ y en el experimento a $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ los datos de estos parámetros fueron $52,14 \pm 0,98$ ms con una abundancia relativa de $0,85 \pm 0,04$. Aunque la banda del tiempo T_{22} fue más heterogénea, no se detectó un patrón similar al observado en el análisis con el músculo congelado de la figura 4.1.9. Se observó aparentemente una intensidad semejante y la anchura de la banda fue parecida a medida que aumentó el tiempo de preparación. El máximo de esta banda se observó a los $212,5 \pm 10,6$ ms con una abundancia relativa de $0,16 \pm 0,02$ en el experimento de $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a los $227,6 \pm 11,7$ ms con una abundancia relativa de $0,14 \pm 0,03$ en el experimento de $2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Por lo tanto, es importante asegurarse que haya ocurrido una descongelación completa de la muestra sobre todo si se trabaja a temperaturas entre 0 y $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ donde la velocidad de descongelación es lenta (figura 4.1.1).

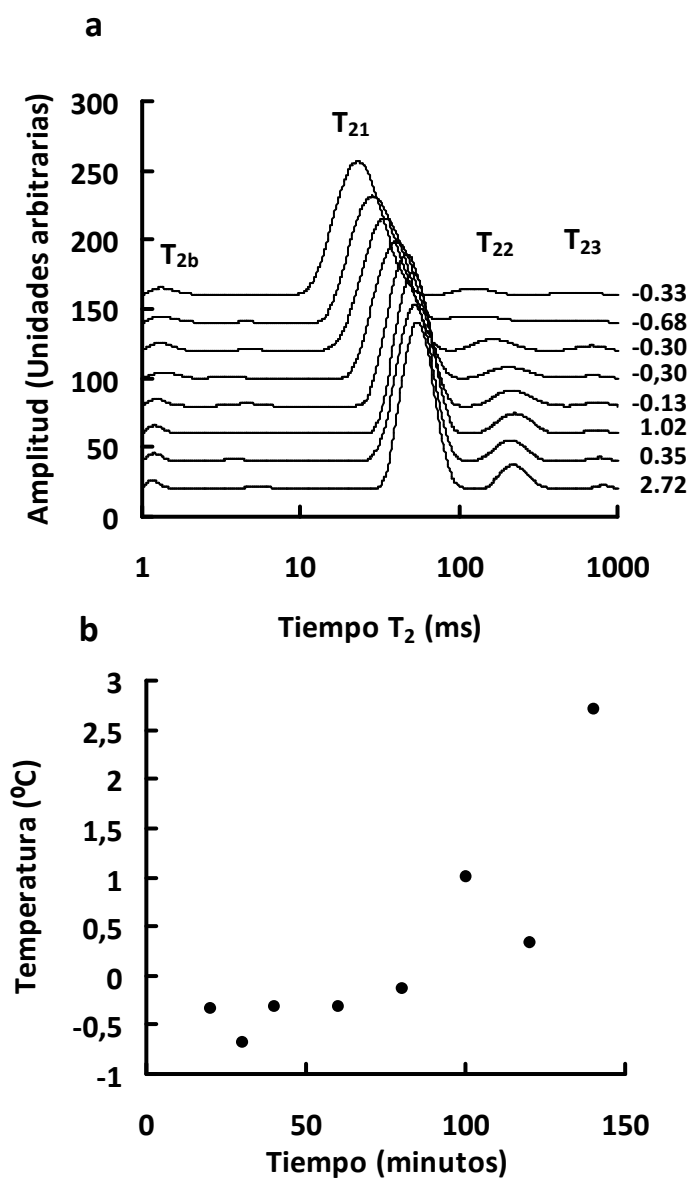
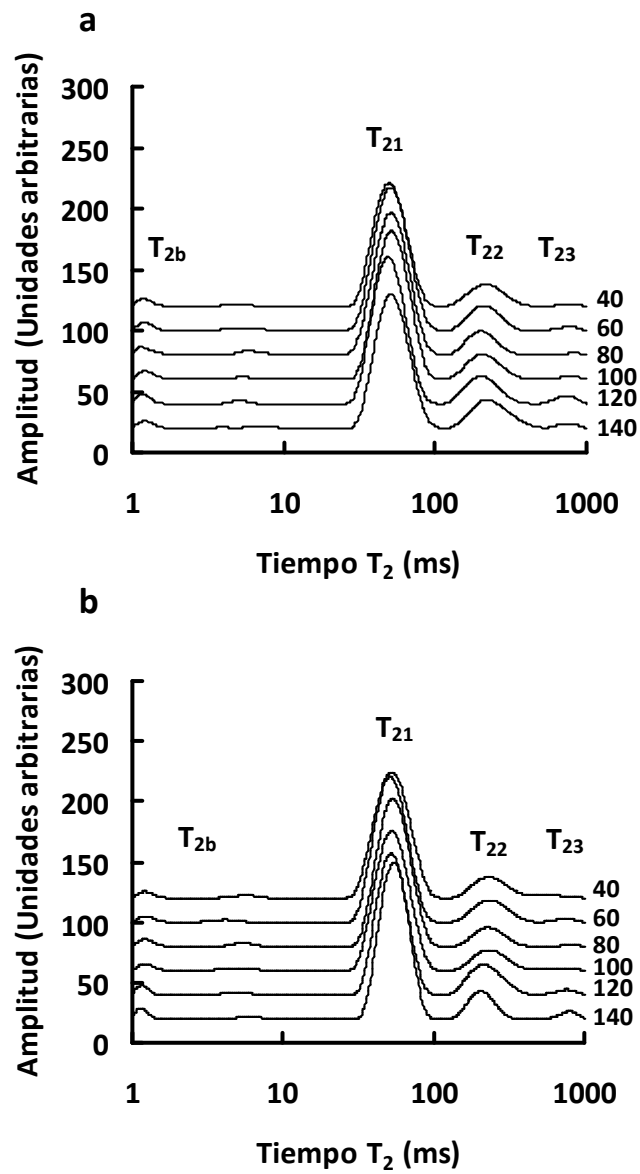


Figura 4.1.9.: a) Distribución de los tiempos de relajación mediante el análisis CONTIN del músculo de merluza durante el proceso de descongelación a 2 °C. Los números de la derecha indican las temperaturas en el músculo al efectuar el análisis. b) Evolución de la temperatura de descongelación a 2 °C



4.1.10. Distribución de los tiempos de relajación mediante el análisis CONTIN del músculo de merluza analizado a 0 °C (a) y a 2 °C (b). Los números de la derecha indican los tiempos de preparación previos al análisis (minutos)

4.1.3.- Efecto del día de análisis

La figura 4.1.11 muestra los parámetros biexponenciales en función de día de análisis con independencia de la temperatura y tiempo de preparación de la muestra. Los valores medios fueron: $A_{21}=0,65\pm0,03$; $T_{21}=51,15\pm1,92$ ms; $A_{22}=0,15\pm0,03$ y $T_{22}=196,73\pm27,11$ ms. La amplitud y tiempo de relajación intermedio (T_{21}) presentaron valores de desviaciones estándar más bajos que los correspondientes a los protones con más movilidad (T_{22}). Este efecto se puede observar gráficamente si se presentan los resultados mediante el análisis CONTIN (figura 4.1.12). En esta figura, se aprecia la estabilidad de los tiempos de relajación T_{21} cuyo máximo valor se encuentra en torno a los 60 ms, sin embargo los tiempos de relajación T_{22} son mucho más variables con valores máximos en rangos que oscilan entre los 200 y los 300 ms aproximadamente. Este hecho es consistente con la mayor heterogeneidad observada previamente en el apartado 4.1.2.

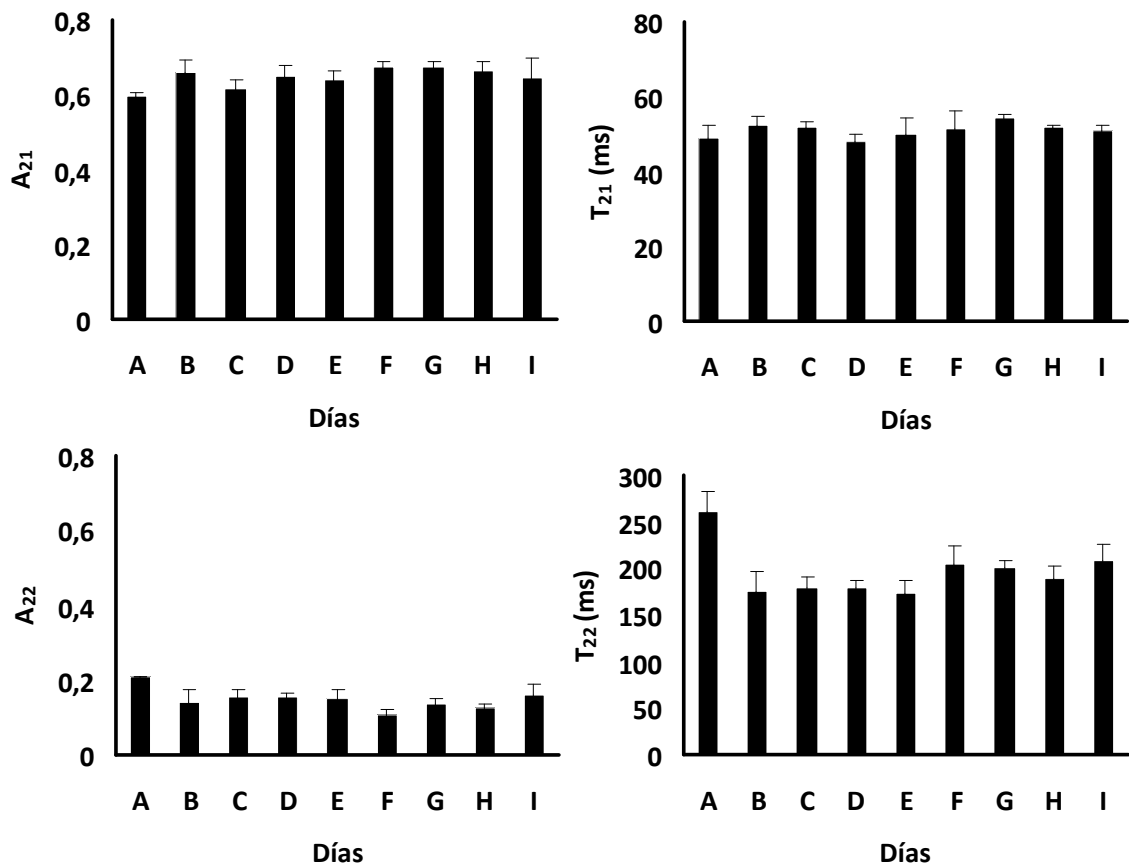


Figura 4.1.11: Variabilidad en los parámetros biexpoenciales con respecto a los diferentes días de análisis en merluza descongelada previamente conservada a -70 durante 4 días y entre 3 días y 13 semanas a -20 °C. Cada barra indica la media y desviación estándar para cada análisis

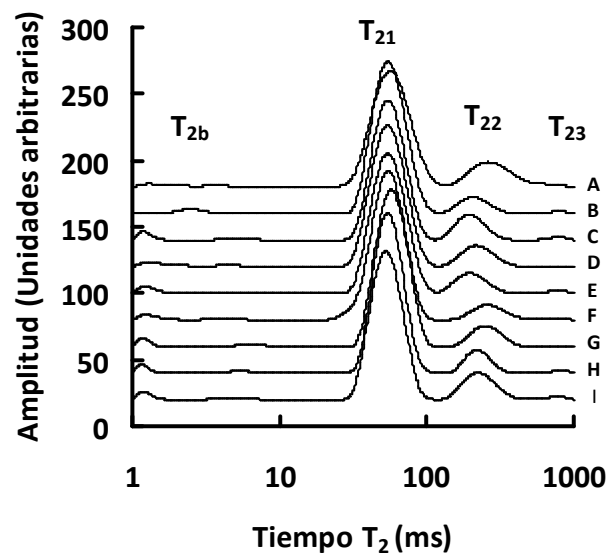


Figura 4.1.12: Variabilidad utilizando el análisis CONTIN con respecto a los diferentes días de análisis (letras de la derecha) en merluza descongelada previamente conservada a -70 durante 4 días y entre 3 días y 13 semanas a -20 °C. Cada perfil representa la media de todos los análisis realizados en el mismo día de análisis

4.1.4.- Efecto del tiempo de preparación prolongado y de las características de conservación de la muestra

Para averiguar la posible existencia de interacción entre las características del músculo y el tiempo de preparación de la muestra, se analizó músculo de merluza conservado a -10 °C durante 85 semanas, con una historia térmica por tanto fuera del rango comercial, y músculo de esta especie que había estado conservada a -70 °C durante 4 días y a -20 °C durante 2 semanas. La temperatura de preparación de este experimento fue de 4 °C y se realizaron análisis de relaxometría al cabo de periodos de tiempo de 1, 3 y 5 horas (figura 4.1.13). No se observaron cambios pronunciados en función del tiempo de preparación en ninguna de las situaciones ensayadas lo que sugiere que las condiciones de análisis pueden ser similares para ambos tipos de muestra. La ausencia de cambios observada a lo largo del tiempo de preparación se mantiene en muestras de diferentes calidades y por tanto es independiente de su historia térmica.

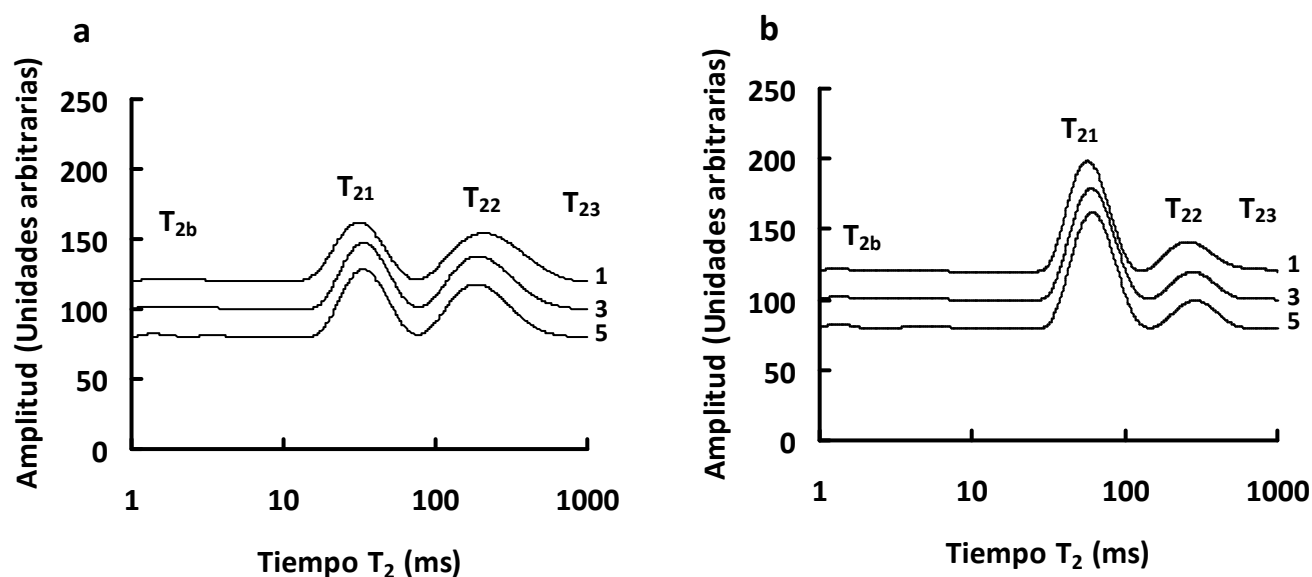


Figura 4.1.13: Distribución de tiempos de relajación mediante el análisis CONTIN, efecto del tiempo de preparación prolongado en músculo de merluza conservado a) a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 85 semanas y b) a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 4 días y después a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 semanas. Cada línea de distribución representa la media de 3 medidas repetidas por tiempo de preparación. Los números de la izquierda indican el tiempo previo al análisis (horas)

Los resultados obtenidos en este apartado sugieren que durante la preparación de la muestra es deseable mantener la temperatura entre 2 y $6\text{ }^{\circ}\text{C}$ sin superar los $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ y es crítico asegurar que la muestra esté descongelada antes de efectuar el análisis. En general, el tiempo de preparación de los paralelepípedos puede variar en un rango amplio tras la descongelación sin que los parámetros de relaxometría sufran cambios. Además se ha comprobado que este tiempo no influye en los valores de los parámetros de relaxometría en muestras de diferentes calidades. Se ha observado también que no existen variaciones pronunciadas en diferentes días. Por último se ha detectado que tanto el tiempo de relajación T_{22} como su correspondiente abundancia relativa (A_{22}) son heterogéneos en los análisis de relaxometría. Sin embargo los parámetros del tiempo de relajación intermedio (T_{21} y A_{21}) son más estables. Estos aspectos se tuvieron en cuenta al abordar los siguientes capítulos.

4.2.- EVOLUCION DE LOS PARÁMETROS OBTENIDOS MEDIANTE RELAXOMETRÍA ^1H RMN DE BAJO CAMPO Y DE LOS PARÁMETROS FISICO-QUÍMICOS EN MERLUZA CONSERVADA A -10 °C

En base a lo fundamentado en el apartado 2 de esta Tesis se procedió a estudiar las posibilidades de la relaxometría ^1H RMN de bajo campo como un método alternativo o complementario a los ya existentes para medir la calidad y/o estimar la vida útil de la merluza conservada en congelación (tabla 2.1). Como se indicó en Material y métodos (figura 3.1.2) se analizó la evolución de los parámetros obtenidos por relaxometría ^1H RMN de bajo campo así como la relación de estos parámetros con otros marcadores habituales en el estudio del control de calidad de esta especie a una temperatura de -10 °C.

4.2.1.- Análisis elementales y pH

Los resultados medios de los análisis elementales y pH se pueden observar en la tabla 4.2.1. Estos no sufrieron alteraciones significativas durante el periodo de conservación por congelación ($p > 0,05$) y están de acuerdo con los resultados obtenidos previamente en esta especie (Careche & Tejada, 1990).

Tabla 4.2.1: Análisis elementales y pH (media \pm error estándar)

% Humedad	% Cenizas	% Grasas	% Proteína	pH
79,8 \pm 0,2	1,28 \pm 0,10	0,8 \pm 0,2	20,0 \pm 0,4	7,00 \pm 0,08

Valores promedio de seis medidas repetidas utilizando una muestra mezcla de varios individuos

4.2.2.- Parámetros físico-químicos

Los parámetros físico-químicos determinados en este experimento (CRA, viscosidad aparente, resistencia a la cizalladura) no mostraron diferencias significativas ($p>0,05$) entre el pescado sin congelar (denominado control A en el apartado 3.2.2.) y el pescado conservado a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante una semana. Tampoco se encontraron diferencias significativas ($p>0,05$) entre el pescado almacenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (denominado control B en el apartado 3.2.2.) a 1, 10 y 25 semanas (resultados no mostrados). En lo que se refiere al control B con respecto a la primera semana de congelación a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ sólo se encontraron diferencias significativas en los datos obtenidos en viscosidad aparente ($p<0,05$).

Se observa que existió una disminución progresiva y significativa ($p<0,05$) de la capacidad de retención de agua en los filetes de merluza conservados a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (figura 4.2.1), de tal forma que partió inicialmente de valores cercanos al 60 % y alcanzó un 43 % en el último tiempo de análisis. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos previamente por Herrero et al. (2005) en las mismas condiciones y con la misma especie. La CRA se ha correlacionado con la jugosidad medida por un panel de catadores entrenado (Jensen & Jorgensen, 1997) y su pérdida en miosistemas se ha explicado en términos de modificaciones en la interacción proteína miofibrilar-agua del músculo (Offer & Knight, 1988). En filetes de merluza conservados en condiciones similares se observaron por espectroscopía Raman cambios en la estructura secundaria de proteínas y en la exposición de residuos alifáticos hidrofóbicos (Careche et al. 1999; Herrero et al. 2004), así como cambios en la región del espectro Raman de 160 cm^{-1} atribuibles a modificaciones en las interacciones proteína-agua (Herrero et al. 2005).

Además, Herrero et al. (2005) observaron tanto a través de la banda de tensión O-H del agua en espectros Raman, como por microscopía electrónica de transmisión, variaciones durante la conservación en congelación que sugerían cambios en la estructura y movilidad del agua muscular.

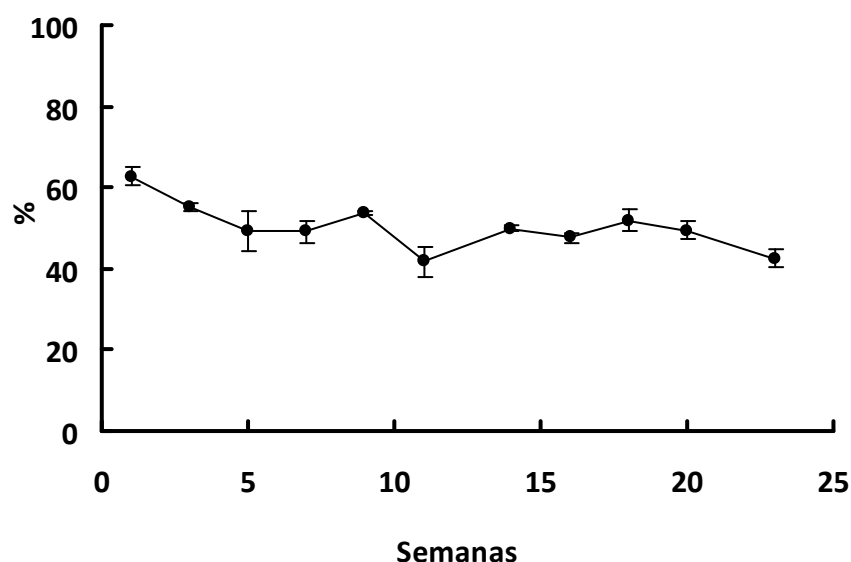


Figura 4.2.1: Evolución del % de CRA de filetes de merluza conservados a -10 °C durante 23 semanas (valor medio \pm error estándar)

La viscosidad aparente (figura 4.2.2) disminuyó desde valores cercanos a 8000 cP ($p < 0.05$) a mayor velocidad durante las primeras 11 semanas. A partir de este momento los valores medios de este parámetro se modificaron más lentamente y a excepción de la semana 16 estuvieron por debajo de 1000 cP. Se considera que el pescado ha pasado el umbral de calidad aceptable cuando la viscosidad aparente está entre esos valores. La disminución de la viscosidad aparente a lo largo del tiempo de conservación en congelación fue la esperada y consistente con trabajos previos (Herrero et al. 2004). Esta propiedad funcional se ha explicado en términos de desnaturalización y agregación de las proteínas miofibrilares del músculo (Herrero et al. 2005).

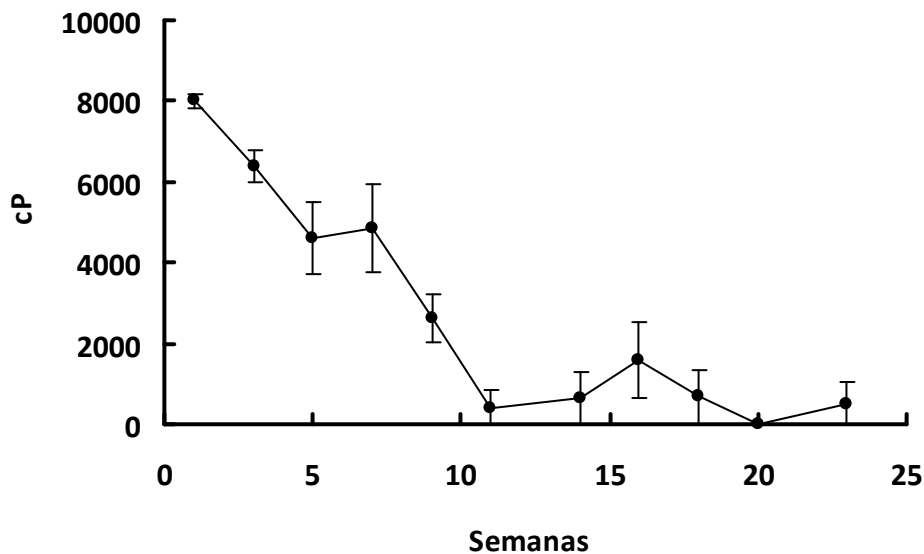


Figura 4.2.2: Evolución de la viscosidad aparente medida por cP de filetes de merluza conservados a -10 °C durante 23 semanas (valor medio \pm error estándar)

La resistencia a la cizalladura aumentó significativamente a lo largo del tiempo de conservación en congelación (figura 4.2.3). Este parámetro osciló entre los ~ 3 N/g, de la primera semana hasta los ~ 11 N/g de la última semana de análisis, siendo lo esperado, ya que habitualmente se obtienen valores mayores en el tiempo a altas temperaturas de conservación (Barroso et al. 1998a; 1998b; Careche & Barroso, 2009). Como ya se comentó en el apartado de la introducción, a lo largo de los procesos de conservación en congelación a altas temperaturas, se produce en algunas especies como bacalao o merluza una reducción del espacio entre las miofibrillas que puede ser responsable del incremento de los valores de resistencia a la cizalladura y en estas condiciones de conservación disminuye el grosor del retículo sarcoplásmico hasta en ocasiones desaparecer (Herrero et al. 2005). Además, se ha visto que los cambios en textura en esta especie pueden guardar relación con la hidrólisis de lípidos que pueden provenir de la desintegración del retículo sarcoplásmico (Sánchez-Alonso et al. 2012).

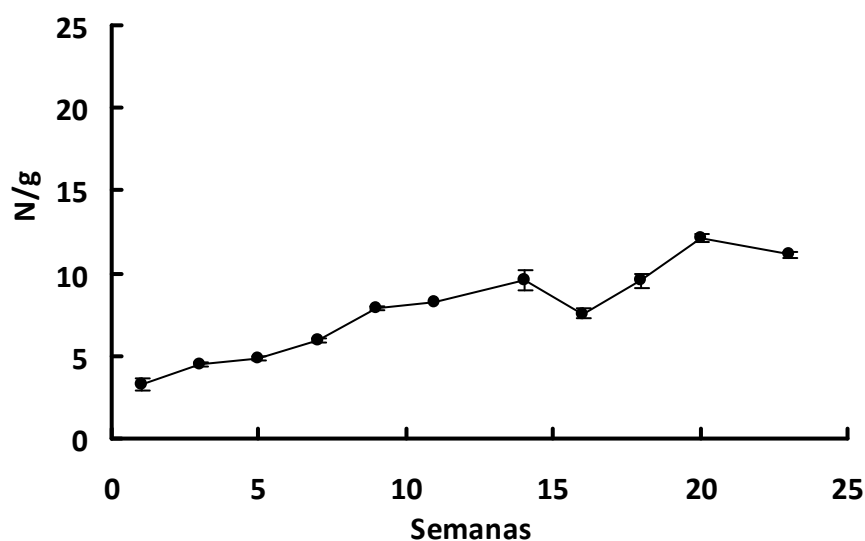


Figura 4.2.3: Resistencia a la cizalladura con la célula de Kramer (N/g) de filetes de merluza conservados a -10 °C durante 23 semanas (valor medio \pm error estándar)

4.2.3.- Parámetros de relaxometría ^1H RMN de bajo campo

Efecto de la congelación.- Los resultados del análisis por biexponenciales en músculo de merluza sin congelar (control A), de merluza conservada a -80 °C (control B) y merluza conservada a -10 °C durante una semana se reflejan en la tabla 4.2.2. El análisis de varianza de un factor no mostró diferencias significativas entre los tres casos excepto para T_{21} que refleja valores de tiempos de relajación de protones con mayor movilidad en el caso del pescado sin congelar.

Tabla 4.2.2: Datos medios \pm error estándar de los parámetros del ajuste por biexponenciales de músculo de merluza sin congelar y congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$

	T_{21} (ms)	A_{21} (%)	T_{22} (ms)	A_{22} (%)
1ª Semana $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$	45 ± 6 a	61 ± 4 a	133 ± 13 a	16 ± 3 a
Control A (sin congelar)	53 ± 9 b	63 ± 20 a	136 ± 63 a	19 ± 23 a
Control B ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$)	46 ± 3 a	62 ± 5 a	116 ± 18 a	17 ± 5 a

Los datos del control A (sin congelar) y de la primera semana de congelación a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ corresponden a valores promedios obtenidos de 3 filetes diferentes, mientras que las muestras del control B a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ son valores promedios obtenidos de 9 filetes diferentes medidos a lo largo de 25 semanas de conservación en congelación. Las letras diferentes que aparecen en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en los valores de cada parámetro

Cuando los resultados se analizaron por CONTIN (figura 4.2.4) se detectaron tres tiempos de relajación en músculo sin congelar. Se obtuvo un tiempo entre 3-5 ms (T_{2b}) con una abundancia cercana al 5 %, otro tiempo con una amplitud del 94 % cercano a los 60 ms que se denominó T_{21} y un tiempo en un rango entre los 400 y los 1000 ms (T_{23}) que tenía una población de un 1 %. En músculo congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ se obtuvieron 4 tiempos de relajación. Los tiempos T_{2b} y T_{21} fueron similares al músculo sin congelar y se detectó una población adicional (T_{22}) con una amplitud en torno al 1 % con unos valores heterogéneos en un rango entre los 240 y los 390 ms. En algunos casos también se detectó una población (T_{23}) entre 500 y los 1000 ms con una abundancia relativa de un 0,7 % aproximadamente. En merluza a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ se obtuvieron poblaciones correspondientes a T_{2b} , igual al de los controles A y B, T_{21} , con tiempos de relajación entre 40 y 60 ms y una abundancia relativa cercana al 90 % y T_{22} entre 160 y 220 ms con una población cercana al 6-10 %. En ocasiones, y a muy baja abundancia (cercana al 1 %), se encontraron muestras con poblaciones a tiempos de relajación cercanos a los 1000 ms (T_{23}). En la figura 4.2.4 también se puede observar que en las muestras congeladas (-10 y $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) la banda correspondiente a los tiempos de relajación T_{21} se ensanchó y disminuyó su amplitud máxima en comparación con las muestras sin congelar.

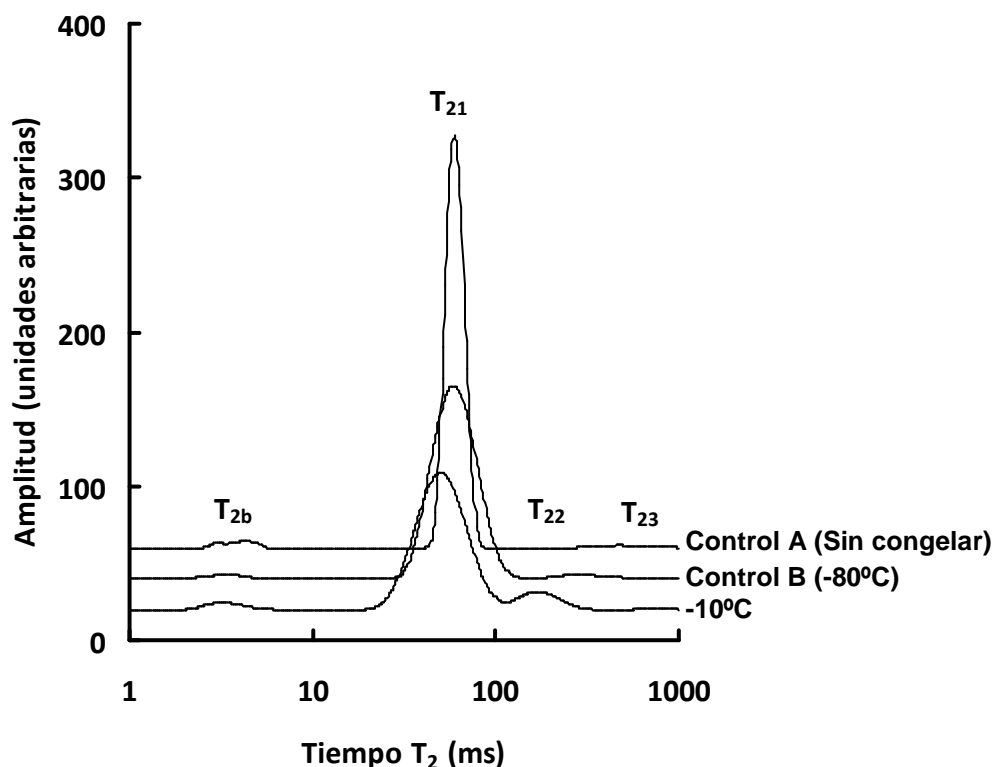


Figura 4.2.4: Perfiles del análisis CONTIN de filetes de merluza sin congelar (control A), de filetes congelados a -80°C y descongelados incluidos en el control B (valores medios de 3 semanas de conservación) y de filetes conservados a -10°C y descongelados en la primera semana de conservación en congelación

El análisis de ajuste por biexponenciales de T_2 realizado por el software del equipo obliga a los datos a ajustarse a dos tiempos de relajación. Aunque se han realizado análisis de más de dos exponenciales a través de otros programas, no se ha considerado su inclusión en la presente memoria ya que los resultados obtenidos por los análisis biexponencial y CONTIN son suficientes para comparar con datos publicados por otros autores. El número de poblaciones así como los valores de movilidad en ms de los protones están de acuerdo con trabajos previos que han utilizado tanto análisis multiexponencial como CONTIN en esta misma especie (Sánchez-Alonso et al. 2014) y en bacalao picado utilizando análisis multiexponencial (Steen & Lambelet, 1997), aunque en este último no obtuvieron valores de tiempos de relajación que fueran

cercanos a 1000 ms. Ambos métodos de análisis presentan ventajas e inconvenientes y las diferencias encontradas entre los resultados obtenidos en pescado congelado y sin congelar por estos análisis corroboran la necesidad de contrastar los datos del ajuste por biexponenciales proporcionado por el equipo en su versión estándar, con los perfiles CONTIN.

Modificación de los parámetros de relaxometría ^1H RMN de bajo campo a lo largo del tiempo de conservación.- El análisis de ajuste por biexponenciales en músculo de merluza conservada a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ indicó que a medida que aumentó el tiempo de conservación los parámetros de T_{21} (T_{21} y A_{21}) disminuyeron, mientras que los parámetros de T_{22} aumentaron (figura 4.2.5). Este hecho también se evidencia en los resultados de CONTIN (figura 4.2.6) y en la figura 4.2.7 donde se representan las diferencias en los espectros CONTIN calculados restando al espectro medio obtenido después de cada semana de muestreo, el correspondiente a la primera semana de conservación. En dicha figura se aprecia que existió una disminución progresiva de una población de protones con tiempos de relajación cercanos a los 55 ms y un incremento de la proporción con tiempos de relajación menores, (32-25 ms) y más altos (115-253 ms). En este último caso se observó una mayor variabilidad en los perfiles. Cabe destacar que los cambios en las amplitudes de ambos tiempos de relajación (A_{21} y A_{22}) fueron más pronunciados durante las primeras 14 semanas (figuras 4.2.5, 4.2.6). A lo largo de la conservación a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ los parámetros T_{21} y T_{22} y sus respectivas amplitudes A_{21} y A_{22} estuvieron también dentro del rango observado en otros trabajos (Sánchez-Alonso et al. 2014; Steen & Lambelet 1997). En comparación con este último, en el presente experimento las variaciones a lo largo del tiempo fueron más bajas. Este hecho es compatible con la menor velocidad de deterioro esperada en filetes respecto al

músculo picado (Borderías et al. 1983) o a diferencias entre especies o condiciones experimentales.

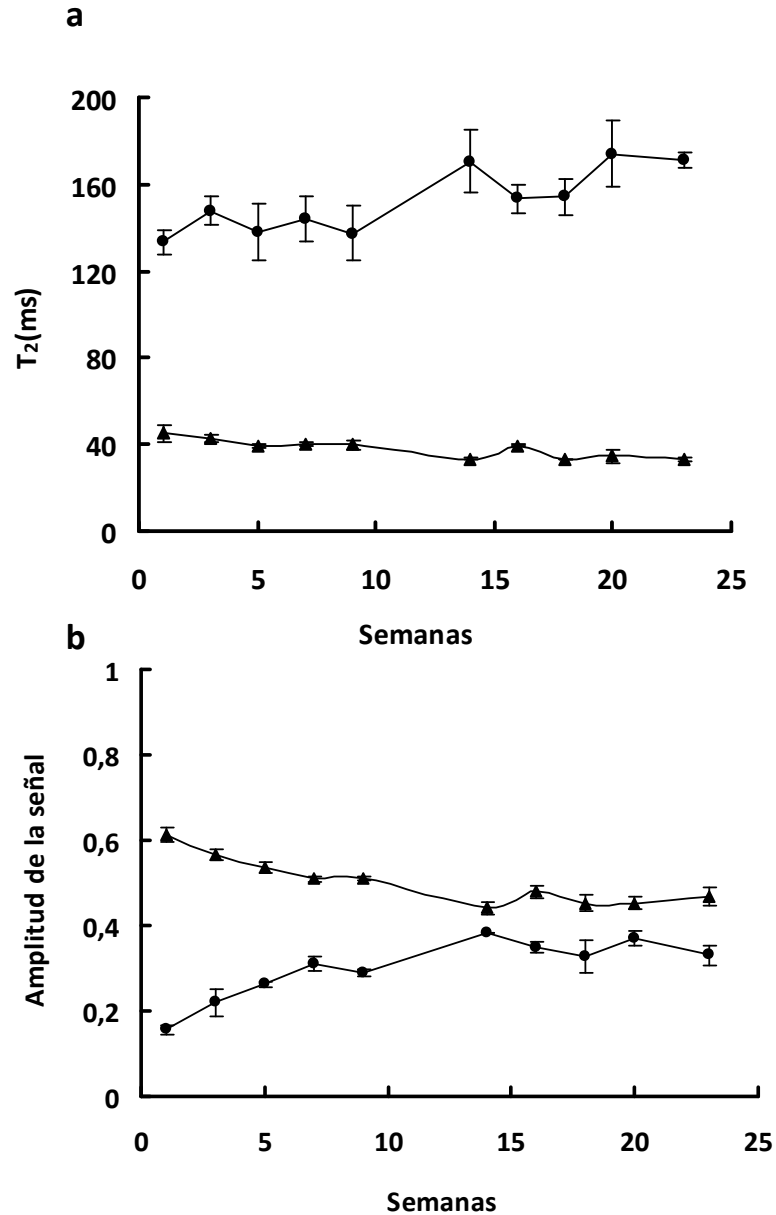


Figura 4.2.5: Evolución de los parámetros del ajuste por biexponenciales de filetes de merluza congelados a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (valor medio \pm error estándar). La figura a indica la evolución de los tiempos de relajación de los protones del agua muscular y la figura b indica la evolución de la amplitud de la señal de estos tiempos de relajación; (▲) representa los parámetros de la relajación T_{21} y (●) los de la relajación T_{22}

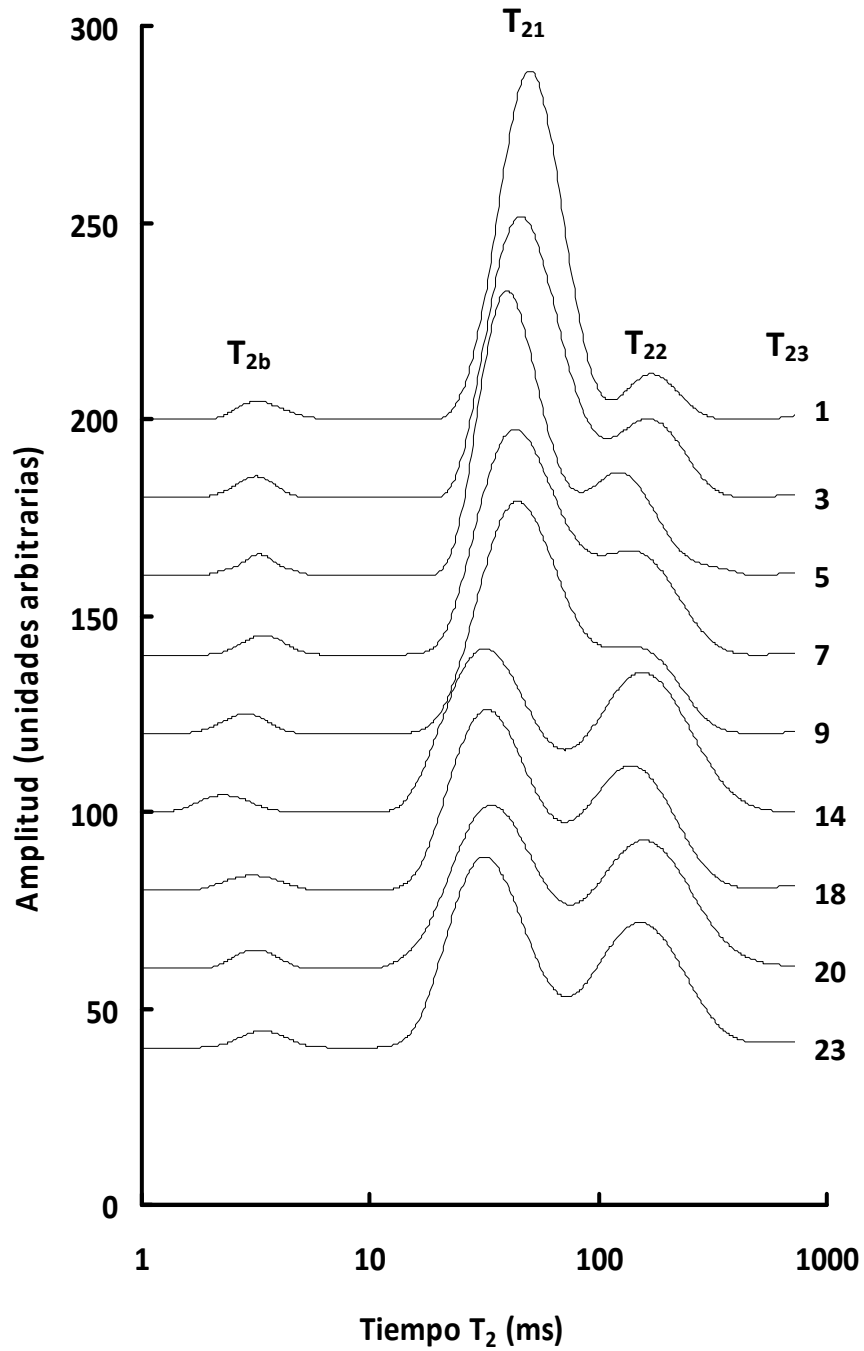


Figura 4.2.6: Distribuciones de los tiempos de relajación mediante el análisis CONTIN de merluza conservada en congelación durante 23 semanas. Los números a la derecha indican las semanas de congelación a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cada curva representa la media de 9 valores (tres medidas por filete en 3 individuos)

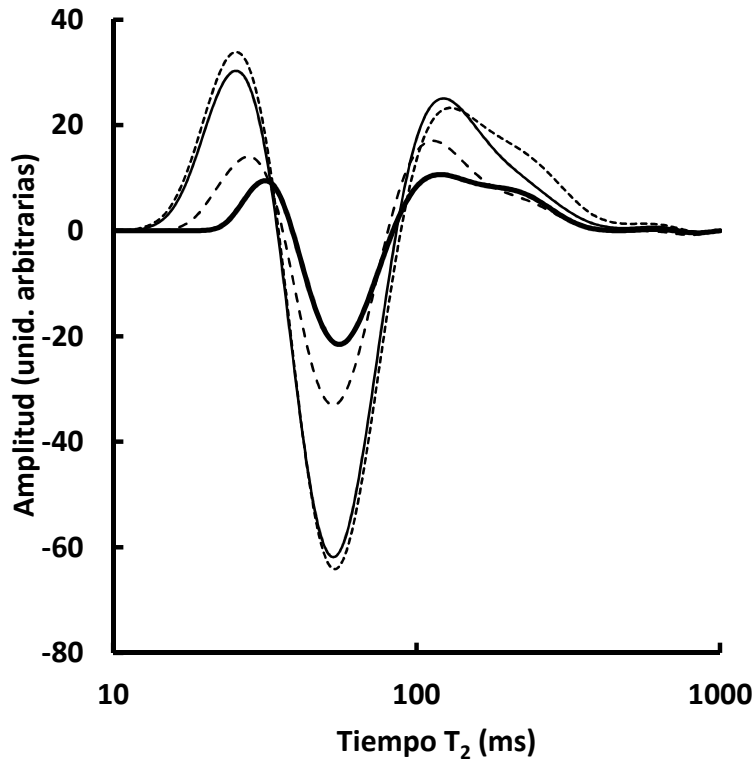


Figura 4.2.7: Espectros diferencia respecto a la primera semana de conservación a -10°C . Cada línea indica una semana de congelación. La línea continua gruesa se refiere a la semana 3, la línea discontinua se refiere a la semana 9, la línea continua se refiere a la semana 18 y la línea punteada se refiere a la semana 23. Cada curva representa la media de 9 valores (tres medidas por filete en 3 individuos)

La figura 4.2.8 muestra la relación entre los resultados analizados por el ajuste de biexponenciales y el análisis CONTIN. Se observa una gran correspondencia entre los resultados obtenidos en A_{22} y T_{21} . Sin embargo en lo que se refiere a la amplitud A_{21} se aprecia que en las primeras semanas existen unos valores que son superiores con el análisis CONTIN que los obtenidos por el ajuste de biexponenciales llegando a ser similares en los últimos tiempos de análisis. Los valores de T_{22} incrementaron linealmente con el tiempo en el análisis biexponencial, mientras que éstos no sufrieron modificaciones por CONTIN. Es probable que estas diferencias en la evolución de T_{22}

entre ambos métodos sean debidas, como ya se ha dicho anteriormente, a la posibilidad de que el análisis biexponencial haya obligado al tiempo adicional (T_{23}) a formar parte de la población T_{22} , favoreciendo el incremento del tiempo de relajación más largo. La correlación entre los valores de T_{21} , A_{21} y A_{22} estimados por el ajuste de biexponenciales y CONTIN fue alta ($0,91 \leq R^2 \leq 0,95$) con un nivel de significación de ($p < 0,01$), a diferencia de lo encontrado en los valores T_{22} ($R^2 = 0,03$ n.s.).

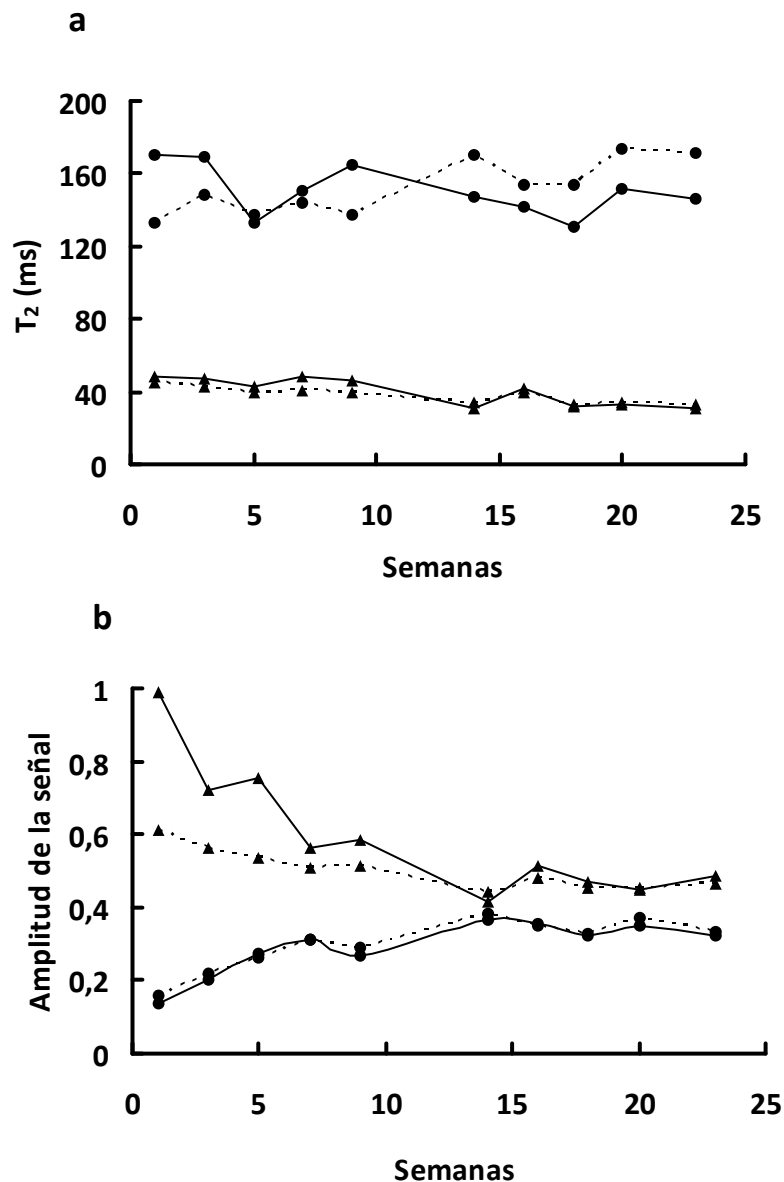


Figura 4.2.8: Evolución durante la conservación en congelación a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ de filetes de merluza de a) tiempos de relajación de los protones del agua muscular T_{21} (▲) y T_{22} (●) y b) amplitudes de la señal de dichos tiempos A_{21} (▲) y A_{22} (●). Las líneas discontinuas corresponden al análisis del ajuste por biexponenciales y las líneas continuas a los mismos parámetros obtenidos por el análisis CONTIN. Cada punto representa la media de al menos 9 valores (tres medidas repetidas en tres filetes de merluza)

4.2.4.- Relación de la relaxometría ^1H RMN de bajo campo, con CRA, viscosidad aparente y resistencia a la cizalladura

Varios estudios han relacionado la CRA y la pérdida de agua por exudación con la relaxometría ^1H RMN de bajo campo. Renou et al. (1985) fueron los primeros en indicar que las características de relajación T_1 y T_2 guardaban correlación con las características de calidad tradicionales en carne de cerdo. Posteriormente varios estudios confirmaron estos resultados y revelaron que especialmente los tiempos de relajación T_{21} estaban altamente correlacionados con la capacidad de retención de agua determinada por métodos gravimétricos. Éstas oscilan entre $R=0,6-0,8$ (Brown et al. 2000; Tornberg et al. 1993). La tabla 4.2.3 muestra la correlación entre los tiempos de relajación y abundancias relativas con la CRA de los datos del presente trabajo. Los resultados de correlación con el análisis del ajuste por biexponenciales estuvieron dentro de este rango y en particular T_{21} mantuvo una correlación positiva de $R=0,58$. En todos los parámetros de este análisis existió correlación a un nivel de significación mayor del 90 %. El valor del tiempo de relajación T_{22} fue el único parámetro que tuvo un nivel de significación al 95 %. En cuanto al análisis CONTIN no existió correlación salvo en el parámetro de la amplitud A_{22} a un nivel de significación del 95 %. Cabe destacar que Bertram & Andersen, (2007) concluyeron que estas correlaciones pueden considerarse buenas teniendo en cuenta la pobre repetitividad de la determinación de CRA.

Tabla 4.2.3: Correlación y regresión lineal de los parámetros obtenidos del análisis de la señal ^1H RMN de bajo campo con la CRA

Parámetros de T_2	Análisis de la Señal	Coefficiente de Correlación	R^2	Nivel de significación
T_{21}	Biexponencial	0,58	0,34	$p < 0,10$
A_{21}	Biexponencial	0,57	0,32	$p < 0,10$
T_{22}	Biexponencial	-0,60	0,37	$p < 0,05$
A_{22}	Biexponencial	-0,52	0,28	$p < 0,10$
T_{21}	Contin	0,49	0,24	N.S.
A_{21}	Contin	0,50	0,25	N.S.
T_{22}	Contin	0,17	0,03	N.S.
A_{22}	Contin	-0,60	0,36	$p < 0,05$

Se ha sugerido que la razón física entre la relajación T_2 y la capacidad de retención de agua estriba en que el agua perdida del músculo se refleja de una manera directa con la amplitud del parámetro T_{22} (A_{22}) (Bertram et al. 2002a). En nuestro caso hemos analizado esta hipótesis estudiando el perfil CONTIN en merluza congelada y tras centrifugación en condiciones similares a las utilizadas para la CRA. Se centrifugó músculo de merluza almacenado a $-10\text{ }^\circ\text{C}$ durante 40 semanas y se analizaron por relaxometría ^1H RMN los perfiles de músculo descongelado y tras centrifugación. Se observó que existe una desaparición casi completa de la población correspondiente al tiempo de relajación más largo (T_{22}) cuando el músculo se centrifugó a 3000 g durante 15 minutos (figura 4.2.9). Esto llevó asociado un aumento de la amplitud de la señal del tiempo T_{21} así como un estrechamiento en su banda con respecto al análisis del músculo sin centrifugar. Los resultados de la figura 4.2.9 sugieren que al menos a tiempos de conservación altos, los protones del agua correspondiente a T_{22} se pierden prácticamente en su totalidad tras la centrifugación. Esto es compatible con lo observado previamente por otros autores en carne de cerdo. En el presente trabajo no se puede descartar que parte de los protones cuya señal es visible en el tiempo de relajación intermedio (T_{21}) correspondan a agua liberada tras la centrifugación. Si

tenemos en cuenta una CRA menor de un 43 % en estas muestras conservadas durante 40 semanas a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, y asumiendo como reales las abundancias relativas obtenidas por cualquiera de los dos análisis matemáticos, entonces, la eliminación de la población T_{22} en la centrifugación no es suficiente para computar el agua total que se libera por centrifugación en estas condiciones. Por otro lado y aplicando lo expuesto por Bain, (2003) para intercambios químicos en NMR, el aumento de la amplitud de la señal y el estrechamiento de la banda T_{21} puede ser indicativo de la ausencia o al menos de la disminución de una manera sustancial de los intercambios lentos difusivos entre protones detectados por los tiempos de relajación T_{21} y T_{22} a consecuencia de la conservación en congelación vistos en el apartado 4.2.3. Este hecho puede estar reforzado si se asume la desaparición casi completa de la señal detectada por el tiempo de relajación T_{22} .

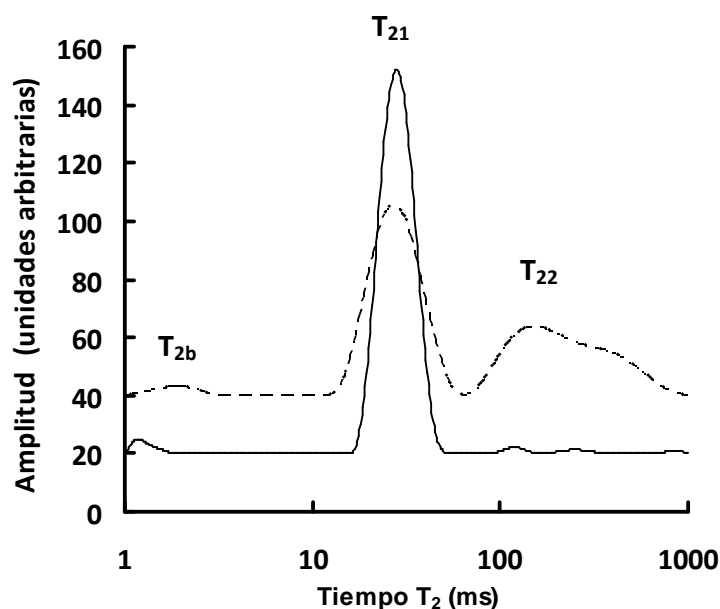


Figura 4.2.9: Distribución de los tiempos de relajación mediante el análisis CONTIN de músculo de merluza almacenada durante 40 semanas. Espectros obtenidos antes (línea discontinua) y después (línea sólida) de centrifugar a 3000 g durante 15 minutos

Los resultados del análisis de correlación entre la viscosidad aparente y los parámetros obtenidos por ^1H RMN de bajo campo se presentan en la tabla 4.2.4. Se puede apreciar una correlación entre todos los parámetros RMN utilizados y esta propiedad funcional ($0,54 \geq R^2 \geq 0,85$) salvo para el tiempo de relajación T_{22} del análisis CONTIN.

Tabla 4.2.4: Correlación y regresión lineal de los parámetros obtenidos del análisis de la señal ^1H RMN de bajo campo con la viscosidad aparente

Parámetros de T_2	Análisis de la Señal	Coefficiente de Correlación	R^2	Nivel de significación
T_{21}	Biexponencial	0,90	0,80	$p < 0,01$
A_{21}	Biexponencial	0,92	0,85	$p < 0,01$
T_{22}	Biexponencial	-0,73	0,54	$p < 0,05$
A_{22}	Biexponencial	-0,89	0,79	$p < 0,01$
T_{21}	Contín	0,83	0,69	$p < 0,01$
A_{21}	Contín	0,89	0,80	$p < 0,01$
T_{22}	Contín	0,27	0,07	N.S.
A_{22}	Contín	-0,83	0,69	$p < 0,01$

La correlación entre la resistencia a la cizalladura y los parámetros obtenidos de la señal de ^1H RMN de bajo campo se presenta en la tabla 4.2.5. Existen correlaciones significativas entre todos los parámetros utilizados ($0,54 \geq R^2 \geq 0,88$) siendo el tiempo de relajación T_{21} de los análisis del ajuste por biexponenciales el más fuertemente correlacionado con R^2 de 0,88 a un nivel de significación del 99 %. En un trabajo anterior (Steen & Lambelet, 1997), utilizando como materia prima bacalao picado, se observó una alta correlación entre la constante de tiempo T_{22} , la dureza determinada sensorialmente y la resistencia a la cizalladura determinada instrumentalmente. Los resultados del presente capítulo están de acuerdo con lo observado previamente en bacalao aunque se han obtenido mejores correlaciones con la señal correspondiente al tiempo de relajación intermedio. La razón puede estribar, como se indicó en el capítulo

4.1, en el hecho de una mayor dispersión en la población T_{22} respecto a la T_{21} . Hay que tener en cuenta que el porcentaje del agua fuertemente unida a macromoléculas (T_{2b}) no varía significativamente en estas condiciones, y la humedad es constante para todos los tiempos de conservación estudiados (tabla 4.2.6) por lo que con la información que se dispone hasta la fecha podemos interpretar que la pérdida de la población T_{21} conlleva un aumento de una población T_{22} intrínsecamente más heterogénea. Es posible que correlaciones ligeramente peores de la resistencia a la cizalladura con T_{22} respecto de T_{21} sean derivadas de estas heterogeneidades. Entre todos los cambios estructurales que ocurren en el músculo de merluza conservada en el estado congelado, se ha sugerido que la progresiva disminución del espacio intermiofibrilar puede resultar la principal responsable de los cambios en la resistencia a la cizalladura (Herrero et al. 2005). Por lo tanto es posible que este parámetro de textura instrumental esté directamente asociado con T_{22} .

Tabla 4.2.5: Correlación y regresión lineal de los parámetros obtenidos del análisis de la señal ^1H RMN de bajo campo con la resistencia a la cizalladura

Parámetros de T_2	Análisis de la Señal	Coefficiente de Correlación	R^2	Nivel de significación
T_{21}	Biexponencial	-0,94	0,88	$p < 0,01$
A_{21}	Biexponencial	-0,93	0,87	$p < 0,01$
T_{22}	Biexponencial	0,89	0,79	$p < 0,01$
A_{22}	Biexponencial	0,82	0,67	$p < 0,05$
T_{21}	Contin	-0,89	0,80	$p < 0,01$
A_{21}	Contin	-0,83	0,69	$p < 0,01$
T_{22}	Contin	0,89	0,79	$p < 0,01$
A_{22}	Contin	0,73	0,54	$p < 0,05$

Tabla 4.2.6: Valores de humedad \pm error estándar de filetes de merluza conservados en congelación durante un máximo de 23 semanas

Tiempo de Conservación (semanas)	Humedad (%)
1	80,35 \pm 0,17
3	80,40 \pm 0,41
5	79,28 \pm 0,46
7	80,23 \pm 0,32
9	79,29 \pm 2,91
11	80,60 \pm 0,69
14	80,05 \pm 1,04
16	80,72 \pm 1,82
18	79,40 \pm 1,20
20	79,09 \pm 0,95
23	81,16 \pm 0,91

En cada tiempo de análisis se analizaron 3 filetes de merluza y se realizaron tres medidas repetidas por filete

4.2.5.- Análisis de regresión entre los parámetros de relaxometría y el tiempo de conservación a -10 °C. Predicción del tiempo de conservación en congelación

Análisis de regresión simple utilizando los parámetros biexponenciales.- Los parámetros físico-químicos se han utilizado en la literatura para realizar modelos que puedan estimar la calidad del pescado y predecir su vida útil. En particular los valores de resistencia a la cizalladura y viscosidad aparente han servido para elaborar modelos que pueden estimar la vida útil en merluza congelada (Herrero & Careche, 2006). En este apartado se muestran los análisis de regresión simple utilizando los parámetros biexponenciales.

Un análisis de regresión simple mostró que existía una relación lineal entre las constantes T_{21} y T_{22} y el tiempo de conservación en el estado congelado. Esta relación se observó asimismo en las abundancias relativas cuando se analizaban los tiempos menores de 16 semanas. Como se indicó anteriormente, los datos de viscosidad aparente reflejaron que a partir de las 11-16 semanas el pescado no tenía una calidad aceptable. Los valores de regresión muestran una relación lineal con el tiempo de conservación (figuras 4.2.10 a-d). La figura 4.2.11 a-d muestra estas regresiones cuando se efectúan con los datos medios y se puede observar cómo los R^2 mejoran significativamente.

Uno de los parámetros más relacionados con la pérdida de calidad del pescado congelado es el tiempo de conservación. Los resultados obtenidos por análisis de regresión simple de los parámetros obtenidos por el análisis biexponencial (figuras 4.2.10 y 4.2.11) sugieren que para $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ es posible encontrar un modelo que prediga el tiempo de conservación aparente del pescado a través de la relaxometría ^1H RMN de bajo campo. Los tiempos de relajación (figura 4.2.10 a y b; figura 4.2.11 a y b) tuvieron una evolución lineal a lo largo de todo el periodo estudiado. Por otro lado, esta evolución lineal de las amplitudes A_{21} y A_{22} (figura 4.2.10 c y d; figura 4.2.11 c y d) fue sólo hasta las 14 primeras semanas de conservación, que consideramos que es el período máximo de vida útil para la merluza congelada a esta temperatura. Este periodo está justificado en los resultados obtenidos mediante la viscosidad aparente (ver apartado 4.2.2). Una de las ventajas de estos datos es su mayor poder discriminativo durante las primeras semanas de conservación en comparación con otros métodos espectroscópicos, como puede ser la espectroscopia de Raman (Herrero et al. 2004), con peor poder analítico durante las primeras semanas de conservación, incluso a las altas temperaturas objeto de estudio. Por ello, los resultados de los parámetros A_{21} y A_{22}

pueden ser de gran utilidad en rangos de tiempo y por lo tanto de calidad, en los que el pescado tiene mayor valor comercial.

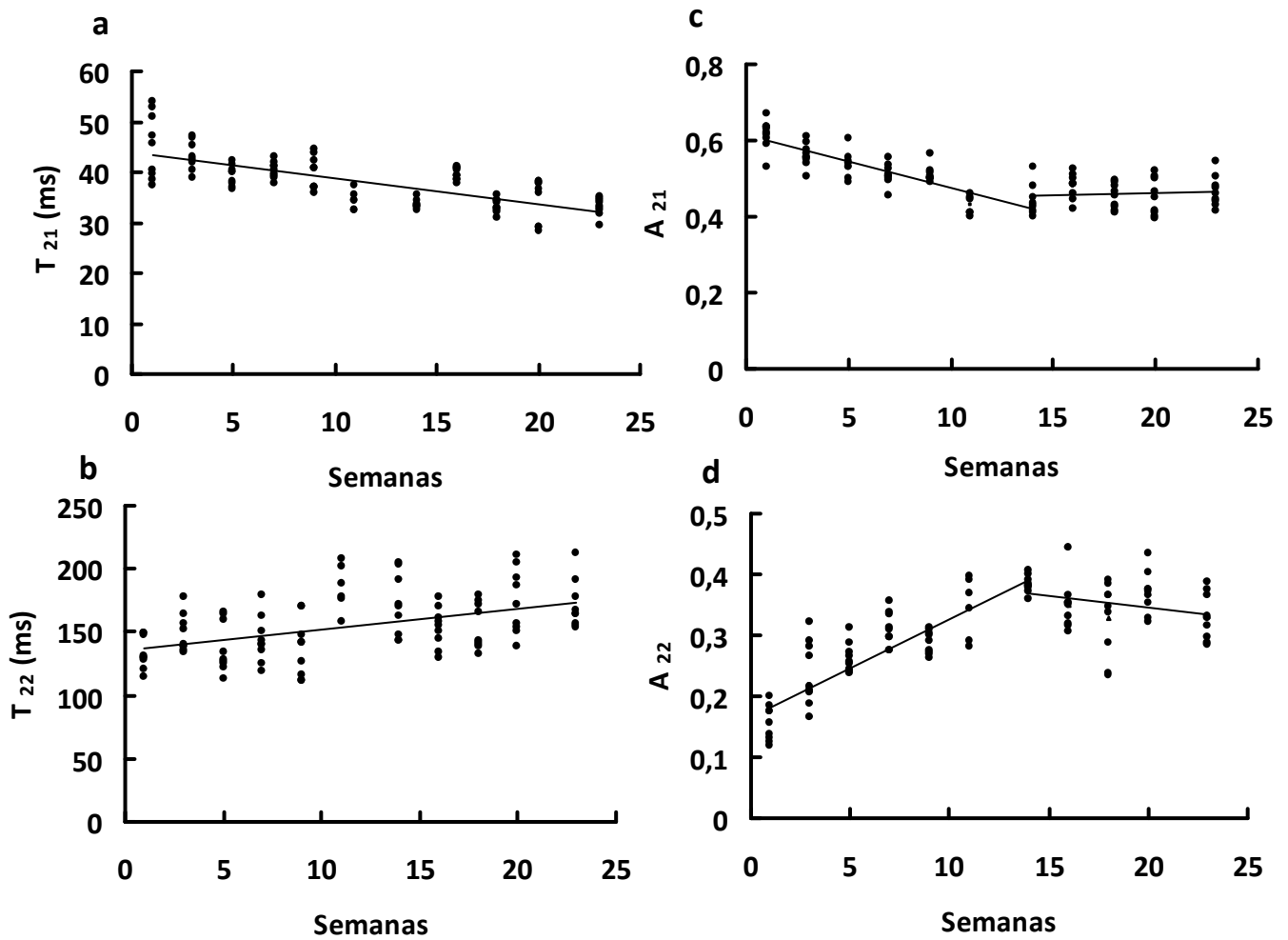


Figura 4.2.10 a-d: Regresión lineal estimada por el análisis biexponencial para predecir el tiempo de conservación a -10°C , donde cada punto corresponde a una medida por individuo (en total 9 medidas por cada tiempo de conservación). Las fórmulas de regresión fueron para los tiempos de relajación: a) T_{21} ($y = -0.50x + 43.71$; $R^2 = 0.50$), b) T_{22} ($y = 1.62x + 135.79$; $R^2 = 0.22$) y para sus correspondientes amplitudes: c) A_{21} (14 primeras semanas: $y = -0.014x + 0.613$; $R^2 = 0.88$) y d) A_{22} (14 primeras semanas: $y = 0.0164x + 0.1648$; $R^2 = 0.93$)

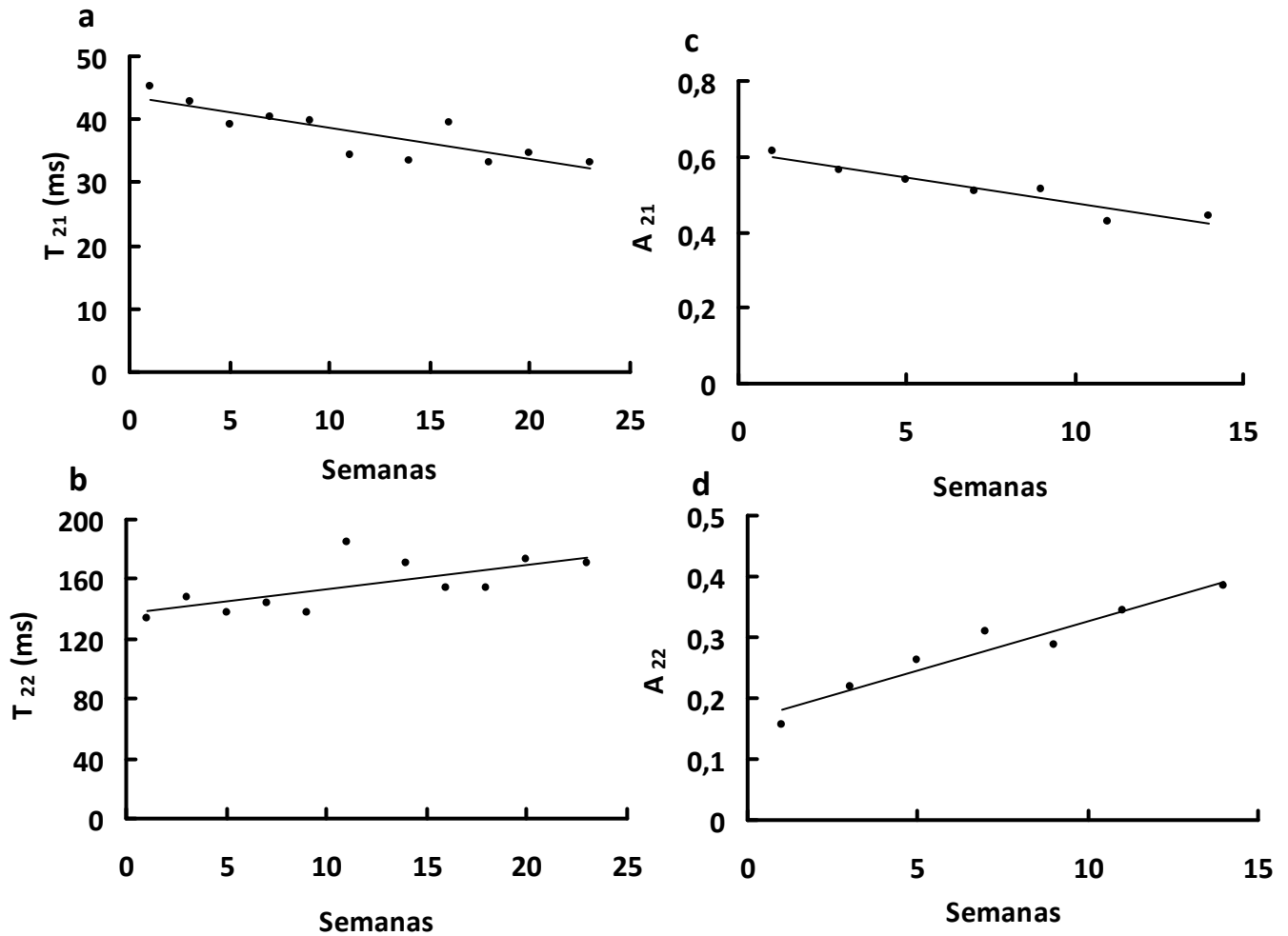


Figura 4.2.11 a-d: Regresión lineal estimada por el análisis biexponencial para predecir el tiempo de conservación a -10 °C, donde cada punto corresponde a la media de todas las medidas realizadas en cada tiempo de conservación. Las fórmulas de regresión fueron para los tiempos de relajación: a) T₂₁ ($y = -0.4922x + 43.461$; $R^2 = 0.7129$); b) T₂₂ ($y = 1.6241x + 136.61$; $R^2 = 0.4594$); c) A₂₁ ($y = -0.0136x + 0.6124$; $R^2 = 0.906$ para las 14 primeras semanas) y d) A₂₂ ($y = 0.0161x + 0.1656$; $R^2 = 0.9273$ para las primeras 14 semanas)

Análisis por componentes principales y regresión por mínimos cuadrados parciales

utilizando los parámetros del análisis CONTIN.- Con objeto de estudiar la estructura

de los datos CONTIN se realizó un análisis por componentes principales. Se observó

que con 4 componentes se explicaba el 95 % de la varianza. Así, el componente 1 (PC1)

explicaba un 66 %, el PC2 un 16 %, el PC3 un 8 % y finalmente el PC4 explicaba un 5

% de la variabilidad encontrada. De estos componentes, sólo los dos primeros parecían

tener una clara relación con el tiempo de conservación. La figura 4.2.12 a-d, refleja los pesos de cada componente principal así como las puntuaciones.

La regresión parcial por mínimos cuadrados con los perfiles CONTIN (figura 4.2.12 e y f) al igual que en el análisis de la regresión simple de los parámetros A_{21} y A_{22} , tampoco siguió una tendencia lineal a lo largo de la conservación en congelación excepto durante las primeras 14 semanas. Por ello el modelo se realizó utilizando sólo las 14 primeras semanas de conservación y se utilizaron tres componentes principales. Con éste se obtuvo un coeficiente de correlación $R^2=0.98$ y un error de ± 1 semana. La regresión y errores del modelo de validación fueron de 0,92 y 1,8 respectivamente. La pendiente fue cercana a la unidad en ambos casos.

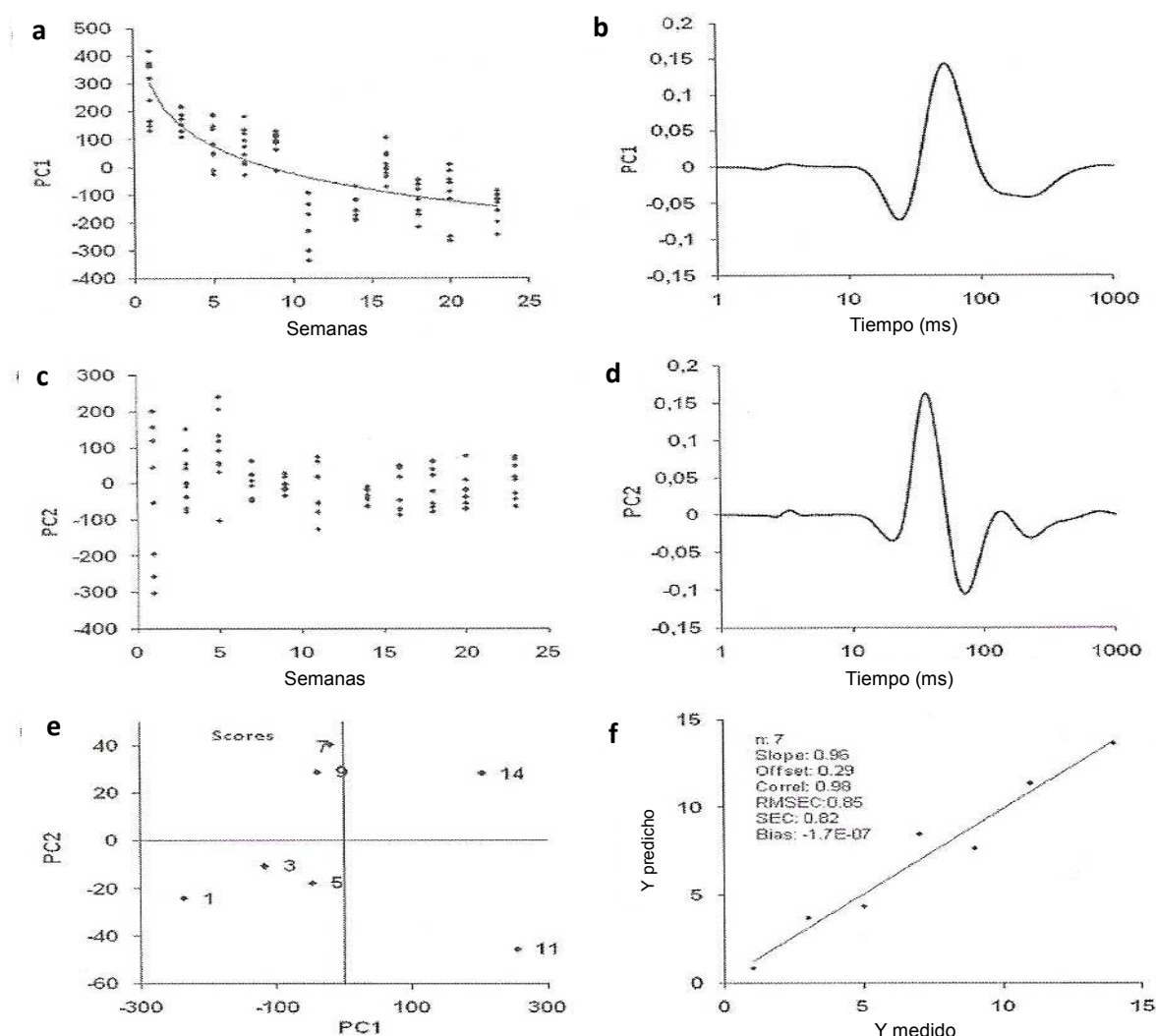


Figura 4.2.12: a-d) representan el análisis por componentes principales obtenido mediante los datos del análisis CONTIN durante 23 semanas de conservación a -10 °C. a y c, representan las puntuaciones frente al tiempo de conservación del PC1 y del PC2; b y d representan los pesos de cada componente principal. e-f) se refieren al modelo de regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) con los espectros del análisis CONTIN como variable X y el tiempo de conservación a -10°C como variable

Los resultados de este apartado muestran que durante la conservación de merluza congelada a -10 °C existen cambios en el comportamiento de los protones del agua muscular observables mediante la relaxometría ^1H RMN de bajo campo. El análisis de correlaciones simples sugiere que es posible utilizar esta relaxometría como método alternativo o complementario para estimar la calidad del músculo de pescado congelado. Tanto los análisis de regresión simple utilizando los parámetros biexponenciales como los análisis de regresión por mínimos cuadrados parciales utilizando los parámetros CONTIN permiten predecir el tiempo de conservación a -10 °C. Estos resultados sugieren que la relaxometría ^1H RMN de bajo campo es una técnica apta para evaluar la calidad de la merluza almacenada en congelación así como para estimar su vida útil al menos a altas temperaturas de conservación.

Una vez evaluadas las modificaciones que ocurren en relaxometría ^1H NMR de bajo campo durante la conservación a una temperatura fija, el siguiente paso fue ver la posibilidad de modelización en función de la temperatura y el tiempo.

El contenido de este capítulo ha sido publicado en la revista Food Chemistry: **Sánchez-Alonso, I., Martínez, I., Sánchez-Valencia, J., & Careche, M.** (2012). Estimation of freezing storage time and quality changes in hake (*Merluccius merluccius* L.) by low field NMR. *Food Chemistry*, 135(3), 1626-1634. **Ver anexo: punto 1**

Estos resultados se presentaron como comunicación oral en el congreso internacional WEFTA 2011: **Sánchez-Alonso, I., Martínez, I., Sánchez-Valencia, J., & Careche, M.** Use of low field NMR to Estimate freezing storage time and quality changes in hake (*Merluccius merluccius* L.). **Ver anexo: punto 4**

4.3.- EVOLUCIÓN DE LA RESISTENCIA A LA CIZALLADURA Y CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA EN MERLUZA CONSERVADA EN CONGELACIÓN A -10, -20, -30 Y -80 °C. OBTENCIÓN DE MODELOS CINÉTICOS

Con el fin de alcanzar el objetivo 3 se estudió la evolución de parámetros físico-químicos como la capacidad de retención de agua y resistencia a la cizalladura en merluza conservada en congelación según las condiciones expuestas en el experimento C (tabla 2.1 y figura 3.1.4). Después se procedió a la búsqueda de los modelos que más se ajustaran a las cinéticas observadas y se analizó su capacidad para la estimación del tiempo, conocida la temperatura y viceversa, en los rangos estudiados. Se seleccionaron los parámetros CRA y resistencia a la cizalladura por ser dentro de los tres métodos ensayados en el apartado anterior, los que tienen mayor relación con la calidad percibida sensorialmente (Careche & Barroso, 2009; Jensen & Jorgensen, 1997).

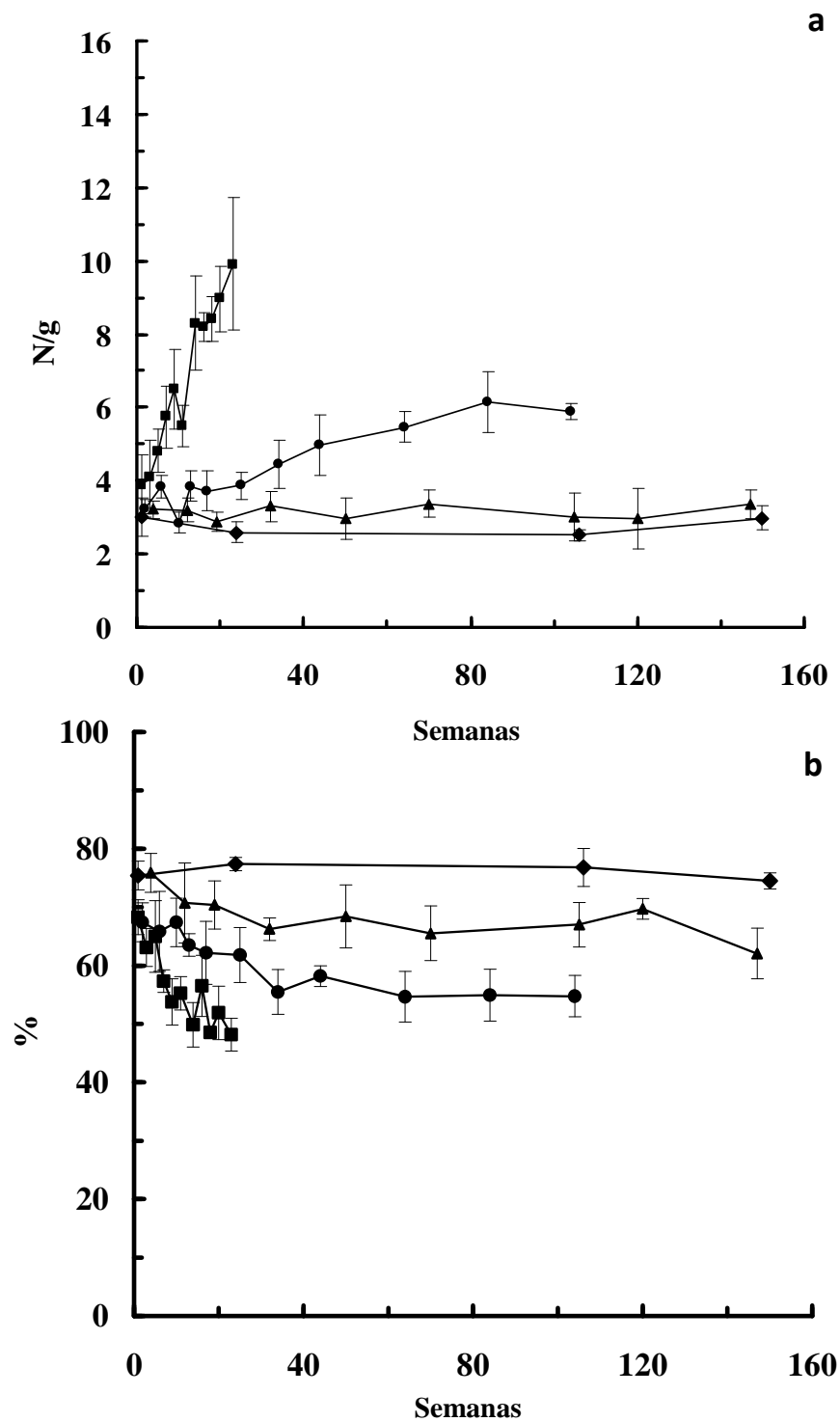
4.3.1.- Análisis elementales y pH

Los resultados medios de los análisis elementales y pH se pueden observar en la tabla 4.3.1. Al igual que en el apartado anterior (4.2) éstos no sufrieron alteraciones significativas durante el periodo de conservación ($p > 0,05$) y estuvieron de acuerdo con los resultados obtenidos previamente en la misma especie (Careche & Tejada, 1990).

Tabla 4.3.1: Análisis elementales (media \pm error estándar)

% Humedad	% Cenizas	% Grasas	% Proteína	pH
80,5 \pm 0,4	1,16 \pm 0,06	0,9 \pm 0,1	19,0 \pm 0,4	6,85 \pm 0,10

Valores promedio de seis medidas repetidas utilizando una muestra mezcla de varios individuos



Figuras 4.3.1: Evolución de los valores de la resistencia a la cizalladura (a) y CRA (b) de filetes de merluza almacenados a -10 °C (\blacksquare), -20 °C (\bullet), -30 °C (\blacktriangle), y -80 °C (\blacklozenge). Valores medios ($n=5$) \pm error estándar

4.3.2.- Evolución de resistencia a la cizalladura y capacidad de retención de agua

La resistencia a la cizalladura medida con la célula de Kramer ha sido utilizada en el estudio de factores que afectan a la calidad del pescado tales como el método y la época de captura, pH, tratamientos antes de la congelación, formación de formaldehído, oxidación de los lípidos, diferentes métodos de cocinado, hidrólisis enzimática, uso de carbonatos, radiación iónica, efectos de altas presiones, efectos de crioprotectores, o tiempo de escaldado (Careche & Barroso, 2009; Sánchez-Alonso et al. 2010). Esta técnica se ha correlacionado con parámetros sensoriales como la firmeza o dureza del músculo en diferentes situaciones tecnológicas y tipos de pescado (Borderías et al. 1983; Licciardello et al. 1982).

Los valores obtenidos en la resistencia a la cizalladura se muestran en la figura 4.3.1 a). A -10 °C fueron similares a los resultados encontrados en el apartado 4.2 de tal forma que durante un total de 23 semanas se produjo un aumento de los valores iniciales de 3,9 veces. Los valores incrementaron 1,8 veces tras 104 semanas a -20 °C y sin embargo no se observó una tendencia clara con respecto al tiempo de conservación a -30 y a -80 °C hasta las 147 y 150 semanas respectivamente. El incremento de la resistencia a la cizalladura a medida que aumenta la temperatura de conservación en congelación de pescado ha sido observado en otros trabajos (Careche & Barroso, 2009; Herrero et al. 2005; Sánchez-Alonso et al. 2010) y como ya se indicó en el experimento del apartado anterior se considera que está asociado a una reducción del espacio intermiofibrilar, a la desaparición del retículo sarcoplásmico y la hidrólisis de lípidos (Herrero et al. 2005; Sánchez Alonso et al. 2012).

En este experimento la CRA disminuyó un 62 % durante las 23 semanas a -10 °C (figura 4.3.1 b), consistente con los resultados del apartado 4.2 y con trabajos previos (Herrero et al. 2005). Las velocidades de pérdida de CRA a -20 °C y -30 °C fueron más bajas que a -10 °C de tal forma que durante 104 semanas a -20 °C, la disminución de este parámetro fue cercano a un 20 % con respecto a los valores iniciales. La variación a -30 °C fue muy pequeña, manteniendo el 90 % del valor inicial a la semana 147 de conservación. La pérdida de CRA a -30 °C fue más baja en este experimento que en trabajos previos (Herrero et al. 2005). No se observaron cambios a -80 °C durante la conservación durante un total de 150 semanas.

4.3.3.- Modelización cinética de la resistencia a la cizalladura

Los resultados obtenidos en el apartado 4.3.2 indican una clara relación entre la resistencia a la cizalladura medida con la célula de Kramer y el tiempo y la temperatura de conservación. La tabla 4.3.2 muestra los parámetros de la regresión de orden 0 para cada temperatura usando la media por semana de análisis. La dependencia de la temperatura fue muy alta existiendo unos valores de la constante de velocidad (k) que se dividía por 10 a medida que la temperatura de conservación disminuía en 10 °C. Los coeficientes de determinación fueron muy altos a -10 y a -20 °C, aunque se encontraron valores muy bajos de R^2 a temperaturas bajas, que es lo esperado al tener una velocidad de reacción baja y los errores estándar comparativamente altos.

Tabla 4.3.2: Parámetros de la regresión de orden cero (\pm error estándar) ($A_0 - A = kt$) de la resistencia a la cizalladura de filetes de merluza almacenados a -10, -20, -30 y -80 °C

		Temperatura (°C)			
Modelo cinético		-10	-20	-30	-80
Orden cero	A_0	3,51 \pm 0,30	3,28 \pm 0,18	3,06 \pm 0,15	2,78 \pm 0,24
	k	0,281 \pm 0,022	0,030 \pm 0,004	0,002 \pm 0,002	0,000 \pm 0,003
	R^2_{aj}	0,94	0,87	0,01	0,50

Donde A es la variable respuesta (N/g), A_0 es el valor inicial, k es la constante de velocidad medida (semanas⁻¹) y t es el tiempo de conservación (semanas). R^2_{aj} corresponde a la R^2 ajustada a los grados de libertad. Los datos están calculados con la media de los valores hallados por tiempo para cada temperatura de conservación

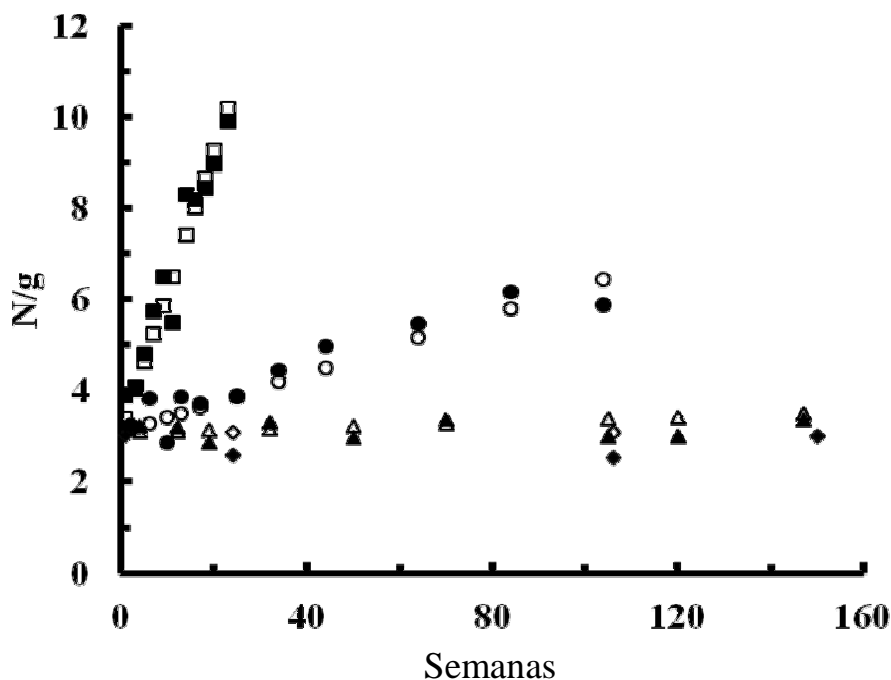
Se obtuvo una primera estimación del incremento de la resistencia a la cizalladura con la temperatura utilizando las constantes de velocidad de la tabla 4.3.2 para estimar los valores del factor pre-exponencial (k_A) y de la constante B acorde a la ecuación modificada de Arrhenius: $k = k_A \exp(-B/T)$. Como se describió en material y métodos, estos valores son necesarios como parámetros iniciales en la aplicación del modelo de regresión no lineal. Luego se realizó esta regresión mediante la ecuación 11 de esa sección [$A = A_0 - k_A t \exp(-B/T)$]. Con la resolución de esta ecuación se obtuvieron los siguientes valores: $A_0 = 3,10 \text{ N/g} \pm 0,08 \text{ N/g}$, $k_A = 2,05 \times 10^{24} \text{ (semanas}^{-1}\text{)} \pm 3,8 \times 10^{24} \text{ (semanas}^{-1}\text{)}$, $B = 15033 \pm 488$ y $R^2 = 0.87$. El error en k_A fue muy alto y como se vio en material y métodos, este error se puede mejorar aplicando al modelo T_{ref} en vez de T y k_{ref} en vez de k . Así la temperatura de referencia escogida fue 253 °K (-20 °C). La estimación de A_0 y B (tabla 4.3.3) así como sus coeficientes de determinación, se calcularon con la ecuación 15 $\{A = A_0 \exp[-k_{ref} t \exp(-B(1/T - 1/T_{ref}))]\}$.

La comparación de los datos observados de la resistencia a la cizalladura frente a los datos predichos se expone en la figura 4.3.2. La existencia de una buena concordancia entre estos valores sugiere que el modelo cinético obtenido refleja bien los cambios relacionados con el tiempo y la temperatura para este parámetro.

Tabla 4.3.3: Parámetros de la regresión (\pm error estándar) de la resistencia a la cizalladura (N/g) de filetes de merluza almacenados a -10, -20, -30 y -80 °C

Modelo	Parámetros	Estimación
Orden cero	A_0	3,09\pm0,08
	k_{ref}	0,032\pm0,002
	B	15017\pm478
	R^2	0,88

Los parámetros fueron extraídos de la ecuación: $A = A_0 - k_{ref} t \exp [-B(1/T - 1/T_{ref})]$. $T_{ref} = 253$ °K, k_{ref} corresponde a la constante de velocidad a la temperatura T_{ref} , B es una constante y T es la temperatura absoluta medida en °K



Figuras 4.3.2: Valores predichos y observados (símbolos vacíos y llenos respectivamente) de la resistencia a la cizalladura medida con la célula de Kramer en función del tiempo de conservación de filetes conservado a -10 °C (■), -20 °C (●), -30 °C (▲), y -80 °C (◆)

Se ha sugerido que la resistencia a la cizalladura medida con la célula de Kramer es un buen método para estudiar los cambios de calidad en algunas especies magras cuya textura sufre alteraciones durante la congelación (Barroso et al. 1998b; Borderías et al. 1983), especialmente cuando se controlan parámetros como la orientación de las fibras de la muestra con respecto a la aplicación de la fuerza (Taylor et al. 2002) o la forma y el peso de la muestra (Bourne, 2002; Careche & Barroso, 2009). Se considera en general más útil analizar la muestra cruda que cocinada ya que aunque los valores son diferentes la relación entre el tiempo y la temperatura es estable (Barroso et al. 1998b) además de facilitar el análisis por requerir menor manipulación.

Como ya se vio en el apartado de la introducción, Herrero et al. (2006) utilizaron esta técnica instrumental junto con la viscosidad aparente para realizar un modelo de

regresión múltiple lineal mediante el cual se podía estimar el tiempo con un error de dos meses. Los resultados obtenidos en este trabajo suponen una mejora los intentos anteriores ya que contemplan la temperatura en el modelo.

4.3.4.- Modelización cinética de la capacidad de retención de agua

Los valores del ajuste cinético de los datos se pueden apreciar en la tabla 4.3.4. Se pudo observar que los ajustes a una cinética de orden cero o de orden 1 daban unos valores de R^2 bastante similares y no muy altos. Por este motivo, se optó por el modelo de conversión fraccional que podría interpretarse en términos de la existencia de dos poblaciones de agua en el músculo de pescado. A_{eq} sería una población que no se pierde en el proceso de centrifugación y la fracción que se pierde [$A_1 \exp(-kt)$] seguiría una cinética de pseudo orden 1.

La estimación de la CRA en función del tiempo y de la temperatura de conservación se realizó, al igual que en el caso de la resistencia a la cizalladura, utilizando una regresión no lineal de los datos ajustados a las tres cinéticas propuestas (cinética de orden cero, de primer orden o del modelo de conversión fraccional). Se utilizaron las ecuaciones con T_{ref} descritas en el material y métodos: $A = A_0 - k_{ref} t \exp[-B(1/T - 1/T_{ref})]$, $A = A_0 \exp[-k_{ref} t \exp(-B(1/T - 1/T_{ref}))]$ y $A = A_{eq} + A_1 \exp[-k_{ref} t \exp(-B(1/T - 1/T_{ref}))]$. Los parámetros obtenidos se muestran en la tabla 4.3.5.

La concordancia entre los valores predichos y los valores observados (figura 4.3.3) en las cinéticas de orden cero y de primer orden fue muy parecida y mejoró con el modelo de conversión fraccional. Se seleccionó este último método para la estimación

del tiempo y de la temperatura de conservación ya que tenía mejor coeficiente de determinación R^2 .

Tabla 4.3.4: Parametros de la regresión no lineal (\pm error estándar) de las ecuaciones de orden cero ($A_0 - A = kt$), primer orden ($A_0/A = \exp(kt)$) y modelo de conversión fraccional ($A = A_{eq} + A_I \exp(-kt)$) de la CRA (%) de filetes de merluza almacenados a -10, -20, -30 and -80 °C

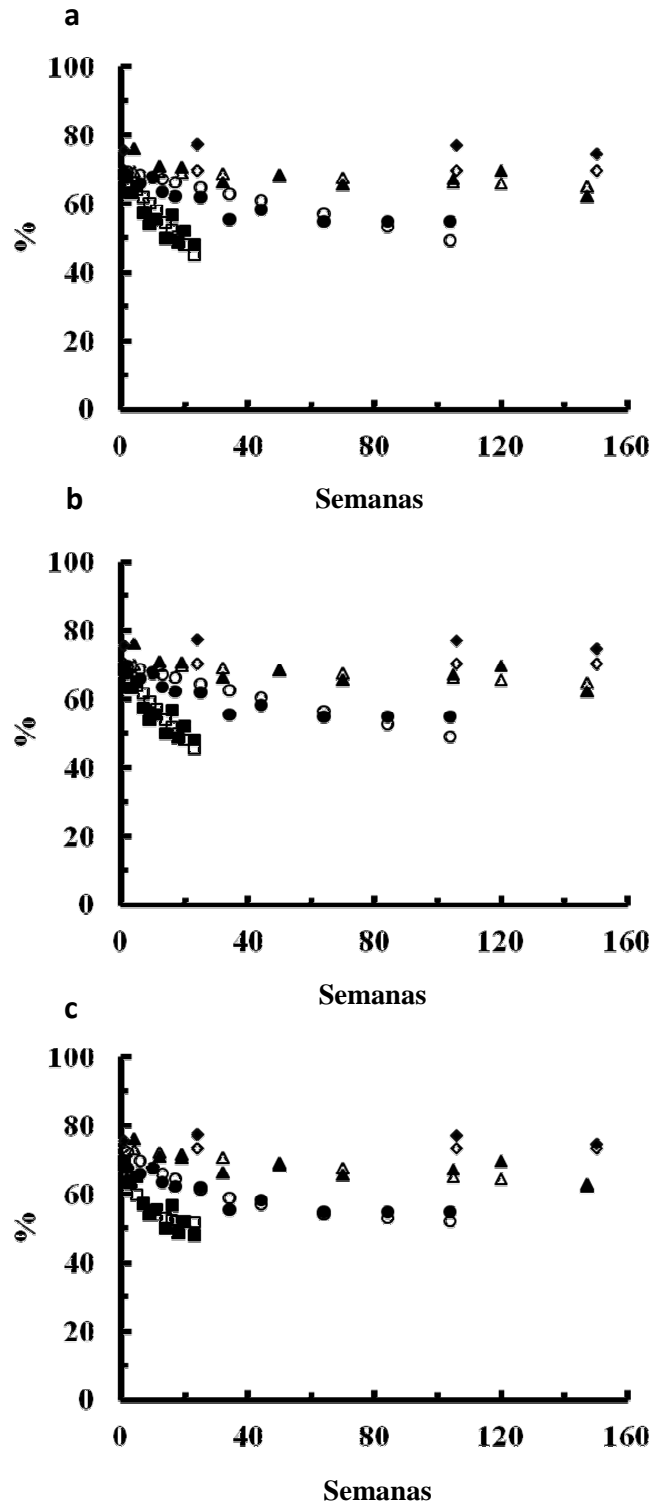
		TEMPERATURA (°C)			
Modelo cinético		-10 (N=11)	-20 (N=11)	-30 (N=9)	-80 (N=4)
Orden cero	A_0	65,72 \pm 1,97	65,41 \pm 1,23	71,82 \pm 1,45	74,31 \pm 2,48
	k	0,828 \pm 0,147	0,132 \pm 0,025	0,058 \pm 0,018	0,029 \pm 0,040
	R^2	0,76	0,73	0,52	0,31
Orden 1	A_0	66,55 \pm 2,51	65,75 \pm 1,23	71,92 \pm 1,48	74,33 \pm 2,47
	k	0,015 \pm 0,003	0,002 \pm 0,000	0,001 \pm 0,000	0,001 \pm 0,001
	R^2	0,80	0,78	0,59	0,34
Modelo de conversión fraccional	A_{eq}	47,44 \pm 4,26	53,83 \pm 1,54	65,89 \pm 1,05	-
	A_I	23,41 \pm 3,70	15,63 \pm 1,66	12,69 \pm 3,67	-
	k	0,108 \pm 0,056	0,035 \pm 0,011	0,066 \pm 0,035	-
	R^2	0,86	0,92	0,77	-

A (%) es la CRA y k es la constante de velocidad (Semanas⁻¹). A_0 es el valor inicial de la CRA. Para el modelo de conversión fraccional, A_{eq} corresponde al valor residual de la CRA, y A_I es la diferencia entre el valor inicial y el valor residual. R^2 es el coeficiente de determinación ajustado. Los datos fueron calculados con la media de los valores por tiempo y temperatura de conservación

Tabla 4.3.5: Parametros de la regresión de la CRA (\pm standard error) de filetes de merluza almacenados a -10, -20, -30 and -80 °C

Modelo	Estimación de parámetros	
Orden cero	A_0	69,55 \pm 0,57
	k_{ref}	-0,195 \pm 0,017
	B	11326 \pm 551
	R^2	0,66
Orden 1	A_0	70,16 \pm 0,58
	k_{ref}	0,003 \pm 0,000
	B	11329 \pm 552
	R^2	0,70
Modelo de conversion fraccional	A_{eq}	51,30 \pm 1,02
	A_1	21,96 \pm 1,11
	k_{ref}	0,031 \pm 0,004
	B	12020 \pm 616
	R^2	0,77

Ajuste para un orden cero ($A = A_0 + k_{ref} t \exp [-B(1/T - 1/T_{ref})]$), primer orden ($A = A_0 \exp [-k_{ref} t \exp (-B(1/T - 1/T_{ref}))]$) y modelo de conversión fraccional ($A = A_{eq} + A_1 \exp [-k_{ref} t \exp (-B(1/T - 1/T_{ref}))]$) con $T_{ref} = 253$ °K. A es el valor de CRA, k_{ref} es la constante de velocidad (Semanas⁻¹) a la T_{ref} establecida B es una constante, t es el tiempo de conservación (semanas) y T la temperatura absoluta (K). A_0 es el valor inicial de la CRA. Para el modelo de conversión fraccional, A_{eq} corresponde a el valor residual de la CRA, y A_1 es la diferencia entre el valor inicial y el residual. R^2 es el coeficiente de determinación ajustado. N=175 individuos



Figuras 4.3.3: Valores predichos y observados (símbolos vacíos y llenos respectivamente) de la CRA en función del tiempo de conservación de filetes conservado a -10 °C (■), -20 °C (●), -30 °C (▲), y -80 °C (◆). a) representa la cinética de orden 0, b) la cinética de primer orden y c), la cinética del modelo de conversión fraccional

La CRA es un método fácil de realizar a la hora de estimar la calidad de músculo de pescado. El parámetro B (tabla 4.3.5), que estima la relación entre la constante de velocidad de la pérdida de CRA con la temperatura de conservación, fue un 20 % más bajo que el obtenido en el modelo cinético obtenido con la resistencia a la cizalladura.

4.3.5.- Predicción del tiempo y de la temperatura de conservación

El siguiente paso fue evaluar la habilidad de estos modelos para predecir el tiempo y la temperatura de conservación, así como la vida útil del pescado. La figura 4.3.4 muestra la estimación del tiempo de conservación basado en las medidas de la resistencia a la cizalladura y en la CRA. Se utilizaron sus correspondientes ecuaciones de regresión no lineal y los parámetros obtenidos mediante estas ecuaciones. La mejor estimación del tiempo de conservación fue observada para muestras almacenadas a -10 °C y -20 °C. A -30 °C sin embargo, la estimación basada en la CRA sólo fue aceptable hasta la semana 70. Las predicciones basadas en la resistencia a la cizalladura a -30 °C y -80 °C fueron las esperadas debido a la falta de cambios en textura.

La estimación de la temperatura de conservación (figura 4.3.5) muestra que las predicciones aceptables podrían hacerse después de la primera semana del músculo almacenado a -10 °C, después de la semana 14 a -20 °C y después de la semana 30 a -30 °C. A pesar de estas limitaciones, el modelo es de utilidad en el rango comercial.

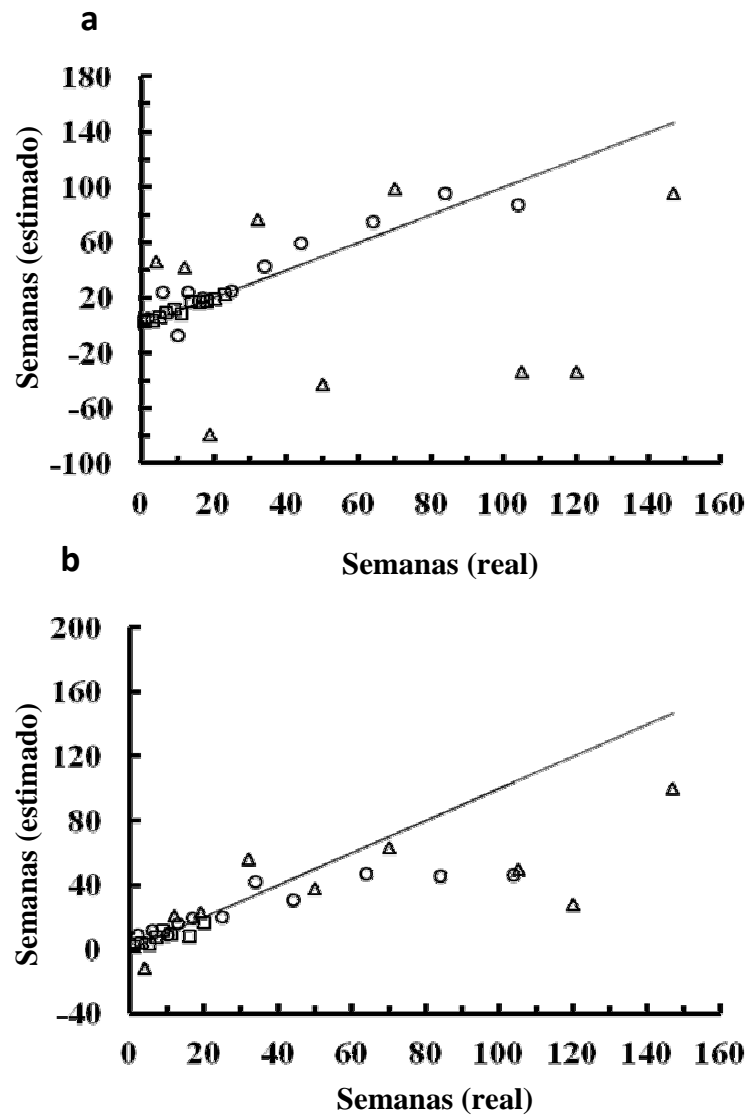


Figura 4.3.4: Estimación del tiempo de conservación basado en la modelización (orden cero) de la resistencia a la cizalladura (a) y de la modelización (conversión fraccional) de la CRA (b). Media de los datos de filetes almacenados a -10 °C (□), -20 °C (○) y a -30 °C (Δ)

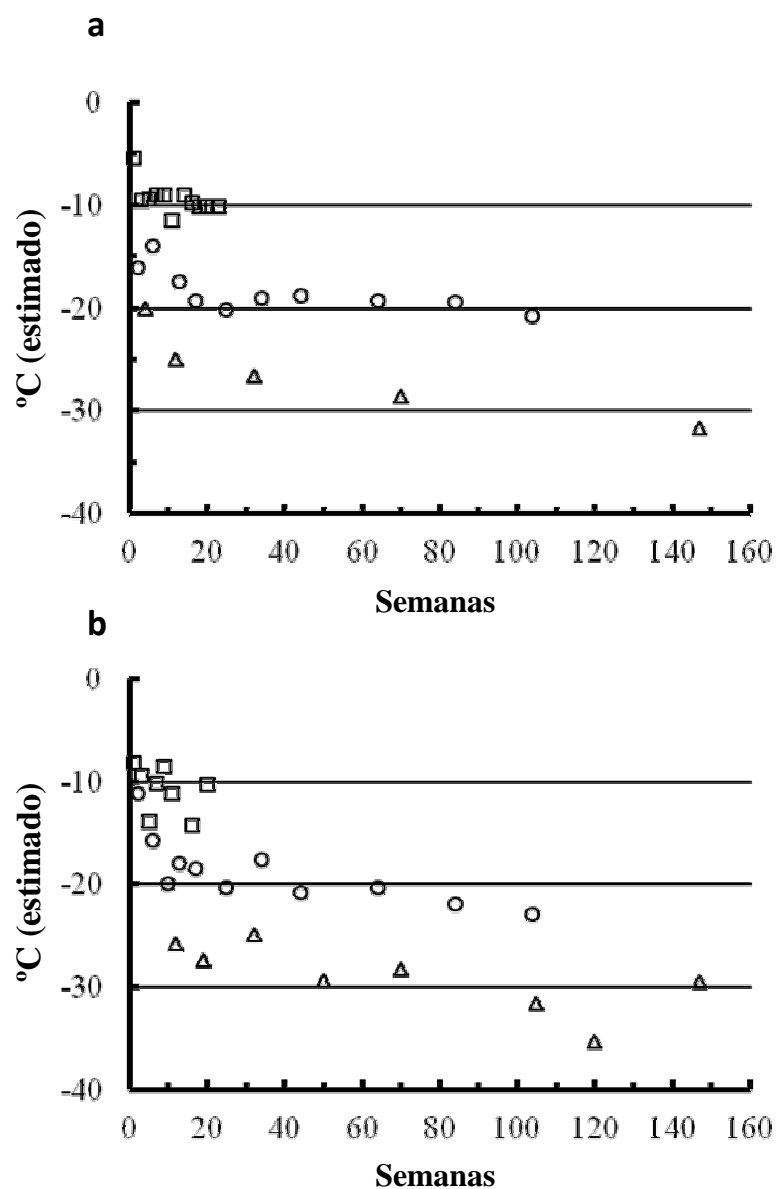


Figura 4.3.5: Estimación de la temperatura de conservación basado en la modelización (orden cero) de la resistencia a la cizalladura (a) y de la modelización (conversión fraccional) de la CRA (b). Media de los datos de filetes almacenados a -10 °C (\square), -20 °C (\circ) y -30 °C (Δ)

Las dos propiedades que se han estudiado en este trabajo (resistencia a la cizalladura y CRA), son fáciles de realizar en un laboratorio y no requieren del uso de una instrumentación cara. Además estas técnicas tienen la ventaja de ser intuitivas ya que mantienen una relación directa con atributos sensoriales (Careche & Barroso, 2009; Jensen & Jorgensen, 1997).

Los dos modelos propuestos en este apartado se asemejan a lo esperado en las reacciones ocurridas en alimentos ya que las cinéticas suelen seguir un pseudo orden 0 o pseudo orden 1 (Taoukis et al. 1997). En pescado o productos del mar conservados en congelación existen pocos trabajos que utilicen este tipo de análisis. Por ejemplo, Tsironi et al. (2009) realizó modelos cinéticos con camarones congelados analizando distintos parámetros físico-químicos, sensoriales y microbiológicos pero no se ha observado ningún trabajo más. Sin embargo si existen más trabajos sobre modelos cinéticos en otros productos pesqueros como refrigerados (p.e. Zhang et al. 2011) o procesos como tratamientos térmicos (p.e. Kong et al. 2007).

En general, el pescado congelado debe ser almacenado por debajo de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se recomienda un máximo de 24 meses de conservación. Esto implica que el rango de calidad comercial del pescado puede ser muy amplio. Los modelos cinéticos de los dos marcadores utilizados en este trabajo proporcionan una información útil de la relación del tiempo y de la temperatura que puede ayudar en la toma de decisiones en el procesamiento del pescado, para establecer de una manera más precisa las especificaciones de calidad, o para la clasificación del producto en diferentes categorías.

Este trabajo establece el uso del modelo de Arrhenius para estimar la relación tiempo/temperatura, pero requiere ser validado con nuevos lotes de pescado así como utilizando otros rangos de temperaturas intermedios entre -10 ° y -30 °C. Es posible utilizar un análisis de vida útil acelerado que puede ser menos costoso y más rápido (Fu & Labuza, 1997). Sin embargo, estos marcadores no se pueden usar a temperaturas donde no existan alteraciones.

Una vez validados los modelos se podrían aplicar para la inspección de la calidad. Por ejemplo se podría utilizar para verificar la temperatura de lotes de pescado en su cadena de distribución. Además estos modelos también podrían servir como una herramienta de autenticación para la detección de fraudes en el etiquetado del producto.

Los modelos pueden tener también una aplicación indirecta para estimaciones de vida útil ya que pueden ser usados para encontrar indicadores de tiempo-temperatura (TTI) que correlacionen mejor con los cambios de calidad en textura ocurridos en merluza congelada. Estos dispositivos indican mejor cambios en la vida útil restante (por ejemplo en resistencia a la cizalladura o CRA) cuya energía de activación es la misma o cercana a la de los TTI (Fu & Labuza, 1997).

Se han usado dos marcadores relacionados con las modificaciones en textura. Sin embargo las estimaciones podrían mejorarse si se pudieran utilizar indicadores adicionales. una combinación de técnicas instrumentales imitando valoraciones sensoriales ha sido evaluado en pescado almacenado en hielo (Olafsdottir et al. 2004). Los marcadores que puedan medir diferentes propiedades de una manera rápida, no destructiva o no invasiva podrían ser particularmente interesantes en el Sector Pesquero.

En este trabajo se observó una clara relación entre los valores de la CRA y de la resistencia a la cizalladura con el tiempo y la temperatura de conservación. Los modelos cinéticos obtuvieron una buena concordancia entre los datos observados y los predichos para ambos casos, que sugiere el uso potencial de estos modelos en estudios de calidad y de vida útil del producto. Consideramos que estos modelos podrían contribuir a sentar las bases para el desarrollo de un método de autenticación de la historia térmica en productos congelados.

El contenido de este capítulo ha sido publicado en la revista Journal of Food Engineering: **Sánchez-Valencia, J., Sánchez-Alonso, I., Martínez, I., & Careche, M.** (2014). Estimation of frozen storage time or temperature by kinetic modeling of the Kramer shear resistance and water holding capacity (WHC) of hake (*Merluccius merluccius* L.) muscle. *Journal of Food Engineering* 120, 37–43. **Ver anexo: punto 2**

Estos resultados se presentaron como comunicación oral en el congreso internacional TAFT 2012: **Careche, M., Sánchez-Valencia, J., Sánchez-Alonso, I. & Martinez, I.** Kinetic Modeling of Kramer Shear Resistance and Water Holding Capacity of Frozen Stored Hake (*Merluccius merluccius* L.) Muscle. **Ver anexo: punto 5**

4.4.- PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS EN MÚSCULO DE MERLUZA CONSERVADA EN CONGELACIÓN A -10, -20, -30 y -80 °C. OBTENCIÓN DE MODELOS CINÉTICOS PARA ESTIMAR LA CALIDAD Y/O LA VIDA ÚTIL

Como se ha mencionado en la introducción, la hidrólisis de lípidos es un indicador importante en el deterioro de merluza conservada en estado congelado. En este apartado, incluido dentro del experimento C, se monitorizó esta hidrólisis en función del tiempo y de la temperatura de conservación en congelación. Se obtuvo el perfil lipídico y se analizó la evolución de los ácidos grasos totales, esterificados y libres a las cuatro temperaturas objeto de estudio. Del mismo modo que en el apartado 4.3, se probó la modelización cinética de los ácidos grasos libres para explorar su utilidad en la estimación de la calidad de merluza, de tal forma que con los resultados obtenidos en este apartado se abordó parte del objetivo 3.

4.4.1.- Perfil de ácidos grasos

La tabla 4.3.1 de la sección anterior muestra que el contenido en lípidos fue de $0,9 \pm 0,1$ %, que está en el rango de lo obtenido por otros autores para la misma especie (Özogul et al. 2009; Nevigato et al. 2012). La composición de ácidos grasos totales así como el porcentaje de cada ácido graso en función del total de ácidos grasos identificados en merluza se muestra en la tabla 4.4.1. Se han detectado 7 ácidos grasos saturados que contribuyeron en un 28,98 % al total. Los ácidos grasos monoinsaturados constituyeron un 28,37 % y se detectaron 9 ácidos grasos poliinsaturados que fueron la fracción mayoritaria con un 42,64 %. El número total de ácidos grasos identificado fue ligeramente inferior al observado por otros autores (Nevigato et al. 2012). En particular,

la relación entre ácidos grasos saturados y poliinsaturados es similar a la de estos autores, estando los ácidos grasos monoinsaturados ligeramente por encima del rango en este trabajo (Nevigato et al. 2012; Özogul et al. 2009). Las diferencias encontradas en cuanto a la composición lipídica en merluza pueden ser debidas a que se comparan lípidos procedentes de merluzas capturadas en diferentes épocas y de origen geográfico distinto (Atlántico Norte vs Mediterráneo).

Tabla 4.4.1: Composición de ácidos grasos en músculo de merluza refrigerada y porcentaje de cada ácido graso

Grupo	Ác. graso	Porcentaje (%)
Saturados	C12:0	0,04±0,01
	C14:0	2,74±1,09
	C15:0	0,40±0,09
	C16:0	19,54±0,74
	C17:0	1,08±0,715
	C18:0	4,92±0,47
	C20:0	0,26±0,04
	Total	28,98±0,89
Monoinsaturados	C14:1	0,10±0,04
	C16:1	4,52±0,52
	C18:1n9c	14,53±2,18
	C18:1n7c	3,20±0,25
	C20:1	4,69±2,03
	C24:1	1,33±0,23
	Total	28,37±1,11
Poliinsaturados	C18:2n6c	1,13±0,29
	C18:3n6	0,11±0,04
	C18:3n3	0,54±0,22
	C20:2n6	0,26±0,07
	C20:3n6	0,12±0,01
	C20:4n6	1,74±0,21
	C20:5n3	7,73±0,56
	C22:5n3	1,44±0,23
	C22:6n3	29,57±2,22
	Total	42,64±1,69

4.4.2.- Modificaciones durante la conservación en estado congelado

Detección y evolución del perfil de los ácidos grasos totales.- La tabla 4.4.2, muestra los mg de FAME totales/g grasa en merluza sin congelar y congelada a -10, -20, -30 y -80 °C obtenidos mediante cromatografía de gases utilizando una metilación ácida. Los datos son el resultado promediado de todos los tiempos de congelación estudiados ya que no se observaron diferencias significativas en función de este parámetro. El análisis de la varianza en función de la temperatura por tipos de ácidos grasos mostró que en general no existieron diferencias significativas ($p>0,05$) excepto en los ácidos grasos saturados C14:0 y C15:0, en los monoinsaturados C16:1, C18:1n7c, y C20:1 y en los poliinsaturados C18:3n3, C20:2 y C20:4n6. No se observó una pauta general de comportamiento por lo que estas diferencias se han atribuido al error experimental.

Tabla 4.4.2: Cuantificación (mg FAME/g grasa) del perfil de los ácidos grasos totales en merluza congelada a -10, -20, -30 y -80 °C y sin congelar mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama aplicando previamente una metilación ácida

Grupo	Ác. graso	Fresco	-10°C	-20°C	-30°C	-80°C
Saturados	C12:0	0,26±0,03	0,25±0,05	0,24±0,05	0,26±0,07	0,28±0,05
	C14:0	16,17±4,98	18,39±4,70	17,60±4,67	14,56±4,27	17,51±2,54
	C15:0	2,40±0,36	2,70±0,40	2,63±0,40	2,41±0,46	2,78±0,55
	C16:0	117,86±11,72	115,06±10,28	113,72±27,66	110,33±9,98	114,61±11,73
	C17:0	6,48±0,45	6,79±0,86	6,83±0,95	6,47±1,10	6,67±0,73
	C18:0	29,74±4,78	28,28±4,27	28,18±4,72	28,53±2,56	26,53±2,46
	C20:0	1,55±0,12	1,72±0,30	1,70±0,28	1,58±0,43	1,66±0,24
Monoinsaturados	C14:1	0,59±0,17	0,66±0,14	0,59±0,11	0,58±0,16	0,70±0,28
	C16:1	27,14±2,78	27,66±3,73	26,87±3,93	24,22±5,84	27,16±3,61
	C18:1n9c	87,98±17,99	84,11±12,74	85,04±24,05	76,01±20,15	90,62±15,45
	C18:1n7c	19,34±2,72	19,48±3,26	19,34±3,06	17,34±3,78	20,90±3,47
	C20:1	27,67±9,59	38,45±14,32	38,23±10,53	28,21±9,98	38,17±7,56
	C24:1	7,98±0,84	8,10±1,62	7,46±1,41	7,33±2,07	7,60±0,97
	C18:2n6c	6,69±1,18	7,41±1,25	7,89±3,14	6,65±2,16	7,35±1,16
Poliinsaturados	C18:3n6	0,64±0,18	0,53±0,24	0,51±0,25	0,45±0,24	0,62±0,29
	C18:3n3	3,18±1,01	3,59±0,89	3,76±1,01	2,80±0,81	3,63±0,77
	C20:2n6	1,57±0,28	1,83±0,36	1,88±0,41	1,58±0,40	1,88±0,32
	C20:3n6	0,69±0,01	0,75±0,21	0,70±0,17	0,71±0,20	0,77±0,28
	C20:4n6	10,53±1,97	9,75±1,85	9,28±1,48	10,43±1,59	9,06±0,97
	C20:5n3	46,68±5,93	47,74±4,45	45,18±5,09	42,15±5,65	45,47±4,56
	C22:5n3	8,64±0,79	9,71±2,15	9,04±1,94	8,64±2,11	9,44±1,60
	C22:6n3	178,87±26,37	183,78±23,75	177,12±19,29	181,51±21,82	180,03±17,45

Detección y evolución del perfil de los ácidos grasos esterificados.- Las tablas 4.4.3 - 4.4.6, muestran los resultados de la cantidad de ácidos grasos en mg FAME/g grasa utilizando una metilación básica y tomando para cada temperatura los valores medios por semana de congelación. Con este tipo de metilación se detectaron los ácidos grasos esterificados. En general, se sabe que el 90 % de la composición lipídica de los peces magros como la merluza son fosfolípidos (FAO, 1998) y por ello se supone que la gran mayoría de estos ácidos grasos formarán parte de los fosfolípidos de membrana.

Tabla 4.4.3: Cuantificación (mg FAME/g grasa) del perfil de los ácidos grasos esterificados en merluza congelada a -10 °C durante 23 semanas mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama aplicando previamente una metilación básica

Grupo	Tiempo (semanas de conservación)													
	Ác. grasos	1	3	5	7	9	11	14	16	18	20	23		
Saturados	C12:0	0,24±0,02	0,24±0,09	0,23±0,05	0,22±0,05	0,21±0,01	0,22±0,09	0,17±0,03	0,17±0,04	0,21±0,03	0,23±0,03	0,24±0,08		
	C14:0	17,79±2,29	14,75±2,59	17,77±2,70	21,28±4,71	15,07±1,89	15,33±3,35	10,94±3,00	11,58±4,31	14,50±3,47	22,41±3,85	20,26±2,97		
	C15:0	2,50±0,36	2,16±0,24	2,43±0,24	2,71±0,71	2,05±0,10	2,41±0,21	1,79±0,40	1,89±0,32	2,07±0,29	2,50±0,51	2,54±0,19		
	C16:0	106,38±8,54	100,08±8,54	97,59±11,22	94,76±15,87	86,77±4,62	88,02±10,39	72,86±5,81	72,59±4,78	86,52±8,72	82,59±13,89	92,95±3,65		
	C17:0	7,00±0,74	6,19±1,43	6,55±0,24	6,84±1,75	5,16±0,54	6,12±0,70	4,73±0,50	3,98±0,91	5,00±0,35	5,33±1,03	5,56±0,96		
	C18:0	22,70±1,28	27,02±2,85	23,95±2,74	21,09±2,81	21,33±3,38	21,57±2,93	20,13±2,79	19,68±0,48	21,71±2,24	16,47±3,05	19,21±1,52		
Monoinsaturados	C20:0	1,24±0,17	0,93±0,10	1,06±0,10	1,19±0,33	0,86±0,06	1,12±0,25	0,78±0,14	0,83±0,29	1,10±0,34	1,08±0,22	1,27±0,08		
	C14:1	0,59±0,07	0,56±0,14	0,54±0,09	0,55±0,11	0,51±0,04	0,57±0,12	0,43±0,16	0,40±0,14	0,41±0,08	0,59±0,14	0,66±0,07		
	C16:1	26,79±3,97	20,92±1,50	22,81±0,76	22,89±4,97	19,68±2,07	19,39±4,33	13,91±4,63	14,90±2,85	18,50±3,08	22,57±4,10	22,87±2,28		
	C18:1n9c	78,02±9,46	67,83±6,85	74,39±10,44	63,06±15,48	53,70±8,79	59,91±12,11	46,15±12,72	50,53±3,15	62,04±10,97	59,18±14,71	68,10±6,54		
	C18:1n7c	18,31±0,43	14,94±2,06	16,75±3,57	13,82±3,14	12,57±1,49	14,89±2,79	11,12±2,69	11,33±0,85	13,58±2,23	13,12±3,38	16,42±1,75		
	C20:1	40,24±19,60	21,76±6,01	31,08±7,45	41,99±9,67	26,52±6,67	30,39±10,27	22,78±13,27	18,26±7,71	26,99±9,61	39,34±4,58	41,09±9,32		
Polinsaturados	C24:1	7,43±1,75	6,91±1,80	7,79±0,36	8,38±3,40	6,17±0,11	6,07±0,89	4,65±0,64	4,95±0,49	6,25±0,51	5,67±2,49	7,64±0,53		
	C18:2n6c	7,00±1,60	5,22±0,69	6,07±0,68	6,89±1,53	4,24±0,65	5,44±0,90	4,00±0,45	4,18±1,10	5,02±1,00	5,84±1,19	5,29±1,14		
	C18:3n6	0,50±0,10	0,34±0,14	0,33±0,10	0,38±0,09	0,24±0,05	0,42±0,18	0,28±0,02	0,23±0,02	0,28±0,05	0,47±0,23	0,39±0,13		
	C18:3n3	3,39±1,41	2,43±0,30	3,02±0,14	3,71±0,91	1,91±0,44	2,71±0,47	1,66±0,27	1,84±0,79	2,35±0,83	3,04±0,49	2,48±0,43		
	C20:2n6	1,65±0,51	1,34±0,20	1,56±0,14	1,82±0,45	1,17±0,16	1,44±0,06	1,22±0,23	1,07±0,27	1,20±0,26	1,39±0,51	1,54±0,20		
	C20:3n6	0,64±0,07	0,60±0,13	0,63±0,12	0,62±0,09	0,41±0,04	0,84±0,53	0,44±0,06	0,41±0,06	0,50±0,07	0,53±0,13	0,50±0,10		
Totales	C20:4n6	7,88±0,56	9,64±1,51	7,87±0,78	6,40±0,66	6,89±0,83	6,62±0,45	6,27±1,42	5,93±0,85	6,16±0,36	4,32±1,16	5,11±0,52		
	C20:5n3	36,38±5,48	36,53±9,25	34,92±6,30	30,40±8,28	25,16±1,09	29,93±3,24	21,08±1,48	21,86±0,40	24,39±6,27	26,26±2,71	22,00±2,72		
	C22:6n3	7,84±2,16	7,62±0,76	8,34±1,00	9,94±2,88	5,88±0,74	7,88±0,68	5,87±0,94	6,04±2,11	6,87±0,81	8,14±2,61	8,10±2,16		
Totales	Totales	149,21±23,03	162,72±11,07	157,29±19,89	153,20±36,78	129,59±11,44	145,95±12,27	118,04±5,53	122,04±8,12	126,53±11,56	105,57±21,16	119,28±6,84		
		543,74±47,28	510,71±34,73	523,97±51,31	512,14±109,37	426,07±21,49	467,23±50,65	369,33±44,73	377,37±20,79	432,19±56,05	426,66±72,66	463,49±31,83		

Tabla 4.4.4: Cuantificación (mg FAME/g grasa) del perfil de los ácidos grasos esterificados en merluza congelada a -20 °C durante 104 semanas mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama aplicando previamente una metilación básica

Grupo	Tiempo (semanas de conservación)											
	Ac. Grasos	2	6	10	13	17	25	34	44	64	84	104
Saturados	C12:0	0,17±0,01	0,25±0,06	0,23±0,04	0,18±0,02	0,22±0,03	0,20±0,05	0,22±0,08	0,19±0,01	0,23±0,10	0,23±0,04	0,20±0,02
	C14:0	13,58±1,65	16,45±2,11	16,05±2,65	15,70±6,58	17,39±4,45	16,79±7,94	19,01±8,35	16,12±6,30	15,92±6,39	20,35±4,16	14,68±7,86
	C15:0	2,50±0,04	2,16±0,23	2,43±0,24	2,71±0,49	2,05±0,46	2,41±0,63	1,79±0,83	1,89±0,45	2,07±0,33	2,50±0,57	2,54±0,40
	C16:0	101,42±11,46	107,43±9,40	102,85±3,47	96,23±10,25	111,42±14,92	100,78±4,81	95,97±12,56	91,11±10,71	94,03±22,79	100,92±12,95	91,88±6,09
	C17:0	7,56±1,07	7,89±1,20	7,05±0,58	6,02±0,93	6,94±0,86	5,46±1,79	6,04±1,63	6,67±1,06	4,91±0,47	6,05±0,48	5,27±0,56
	C18:0	27,46±0,33	27,92±3,18	27,18±2,42	23,86±2,27	22,68±3,71	20,87±5,35	21,65±2,76	23,43±1,54	29,20±11,69	21,73±3,23	21,48±2,82
Monounsaturados	C20:0	0,89±0,17	1,15±0,16	1,06±0,08	0,97±0,34	1,06±0,27	0,88±0,33	0,95±0,26	1,07±0,31	1,07±0,24	1,08±0,06	1,38±0,81
	C14:1	0,66±0,15	0,64±0,13	0,54±0,16	0,50±0,18	0,65±0,10	0,59±0,24	0,60±0,23	0,53±0,24	0,51±0,08	0,61±0,12	0,52±0,05
	C16:1	21,50±3,41	24,04±5,98	22,68±4,05	20,53±5,33	26,22±4,95	20,84±7,77	22,86±5,03	21,56±4,52	18,74±2,87	24,01±6,25	18,97±0,60
	C18:1n9c	72,96±16,85	74,19±23,40	72,68±4,90	61,12±5,24	82,32±14,38	57,16±5,20	68,20±21,67	63,62±19,75	87,65±72,96	73,56±28,74	64,30±2,93
	C18:1n7c	17,22±3,24	16,82±2,10	16,30±2,72	14,66±2,99	18,55±3,21	13,16±3,47	14,79±2,71	13,54±1,75	13,83±4,64	17,12±4,66	14,96±1,55
	C20:1	27,58±7,67	31,19±4,12	32,79±4,24	33,27±19,53	35,32±10,30	30,72±17,80	35,08±13,82	28,61±12,00	28,88±11,74	37,03±10,22	25,05±2,29
Polinsaturados	C24:1	6,27±0,87	7,79±2,09	6,75±1,13	5,91±1,38	8,08±0,87	5,34±0,96	5,93±0,88	7,62±2,03	5,75±1,15	6,62±0,90	5,48±0,05
	C18:2n6c	5,68±0,37	6,56±0,60	5,93±1,08	5,99±1,69	6,74±1,25	5,88±3,01	6,07±2,45	5,39±1,42	10,63±10,44	6,45±1,30	5,45±1,30
	C18:3n6	0,43±0,14	0,48±0,22	0,29±0,10	0,30±0,04	0,30±0,05	0,36±0,25	0,45±0,24	0,28±0,07	0,45±0,12	0,52±0,21	0,29±0,15
	C18:3n3	2,57±0,49	3,11±0,15	3,07±0,74	3,30±1,53	3,44±1,02	2,78±1,92	3,21±1,73	2,52±1,21	2,65±1,03	3,25±0,75	2,69±0,90
	C20:2n6	1,49±0,22	1,48±0,17	1,44±0,15	1,43±0,50	1,63±0,40	1,32±0,33	1,47±0,54	1,33±0,29	1,44±0,58	1,47±0,42	1,29±0,19
	C20:3n6	0,63±0,04	0,55±0,01	0,56±0,02	0,50±0,17	0,56±0,09	0,55±0,19	0,61±0,14	0,62±0,09	0,48±0,11	0,73±0,17	0,58±0,22
Totales	C20:4n6	9,24±0,92	8,24±0,63	8,63±0,72	7,70±2,27	8,47±0,99	6,85±1,88	7,39±0,94	7,66±0,82	6,03±1,21	6,19±0,28	5,68±0,90
	C20:5n3	37,78±3,92	36,97±3,16	38,86±3,88	37,41±5,20	38,17±5,91	30,50±12,46	33,13±8,20	26,44±4,18	24,45±8,21	32,91±6,24	23,83±3,52
	C22:5n3	8,75±1,28	8,60±1,64	8,64±0,44	7,57±1,96	8,44±1,47	7,77±3,64	8,26±3,00	6,55±1,98	6,15±2,95	8,64±3,34	6,63±1,86
	C22:6n3	176,38±16,55	165,57±7,00	174,70±13,57	157,82±25,41	176,49±17,89	143,96±39,73	144,98±18,40	125,91±3,21	116,52±20,99	129,58±3,87	132,13±11,36
Totales	Totales	542,5±55,7	549,8±30,7	550,7±10,2	503,2±52,8	577,8±68,4	474,9±117,8	499,4±95,9	453,0±60,8	471,5±111,1	501,7±94,9	445,1±35,2

Tabla 4.4.5: Cuantificación (mg FAME/g grasa) del perfil de los ácidos grasos esterificados en merluza congelada a -30 °C durante 147 semanas mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama aplicando previamente una metilación básica

		Tiempo (semanas de conservación)									
Grupo	Ac. grasos	4	12	19	32	50	70	105	120	147	
Saturados	C12:0	0,21±0,01	0,23±0,11	0,24±0,04	0,25±0,10	0,19±0,01	0,16±0,05	0,21±0,05	0,44±0,42	0,25±0,09	
	C14:0	10,32±4,48	17,07±0,49	15,16±0,88	18,92±2,27	10,14±3,28	10,64±3,77	15,71±3,99	16,34±1,01	16,90±4,23	
	C15:0	2,19±0,93	2,65±0,02	2,33±0,17	2,49±0,31	2,21±0,67	1,90±0,42	2,09±0,44	2,93±0,90	2,69±0,56	
	C16:0	116,76±10,70	109,31±9,56	108,83±2,46	108,34±9,38	102,20±12,46	101,20±7,34	101,75±12,43	104,47±4,16	114,78±0,97	
	C17:0	7,03±2,08	8,36±0,54	6,91±0,21	6,98±1,56	5,24±0,32	5,43±0,50	5,74±0,72	6,73±0,97	7,47±1,00	
Monoinsaturados	C18:0	30,68±3,77	28,60±5,66	27,67±2,29	26,20±0,48	27,95±8,19	27,28±1,53	25,50±0,41	26,87±3,57	28,04±1,24	
	C20:0	0,80±0,25	1,47±0,20	1,04±0,12	1,09±0,27	0,91±0,23	0,69±0,16	0,95±0,22	1,35±0,35	1,28±0,30	
	C14:1	0,52±0,44	0,50±0,01	0,59±0,04	0,63±0,18	0,62±0,43	0,43±0,16	0,50±0,06	1,07±0,84	0,74±0,31	
	C16:1	19,99±8,72	21,30±2,08	24,08±3,34	25,05±4,41	15,25±5,90	17,78±6,46	21,39±4,36	25,00±1,13	25,58±1,51	
	C18:1n9c	58,90±15,07	89,36±13,51	74,31±7,40	76,55±2,51	53,45±11,01	54,17±10,74	62,57±21,25	76,73±11,82	68,15±12,03	
Polinsaturados	C18:1n7c	13,44±2,95	18,03±1,89	17,72±1,97	14,94±4,48	12,66±2,68	7,66±6,47	13,53±4,21	17,17±1,08	17,41±0,54	
	C20:1	17,11±7,31	33,26±10,47	25,97±3,44	28,46±1,94	20,71±5,06	17,73±7,68	24,51±7,74	25,71±6,95	31,59±10,74	
	C24:1	7,13±5,41	6,58±1,05	7,25±1,22	7,11±0,58	4,80±2,21	5,16±1,71	6,68±2,15	9,10±2,25	8,12±1,14	
	C18:2n6c	5,14±1,16	9,65±3,72	6,06±1,21	6,09±0,75	5,54±1,16	4,69±0,45	4,78±1,05	5,93±0,73	6,62±1,14	
	C18:3n6	0,45±0,10	0,50±0,29	0,32±0,07	0,53±0,24	0,38±0,13	0,34±0,12	0,32±0,07	0,58±0,01	0,43±0,09	
Totales	C18:3n3	1,89±0,54	3,46±0,13	2,75±1,07	2,74±0,52	2,18±0,26	1,97±0,32	2,16±0,56	2,95±0,57	3,07±1,01	
	C20:2n6	1,20±0,30	1,82±0,13	1,45±0,26	1,54±0,37	1,35±0,18	1,12±0,34	1,21±0,35	1,60±0,34	1,75±0,28	
	C20:3n6	0,60±0,02	0,71±0,11	0,69±0,24	0,76±0,09	0,68±0,13	0,56±0,15	0,65±0,19	0,39±0,25	0,71±0,13	
	C20:4n6	12,55±1,29	9,26±1,57	9,47±0,57	9,67±0,29	11,11±6,53	9,71±0,56	9,02±0,76	8,65±0,10	9,39±1,54	
	C20:5n3	38,09±1,18	37,32±3,81	39,09±3,96	42,67±4,74	38,44±15,18	33,30±3,22	37,34±3,43	34,57±1,66	35,79±3,17	
Totales	C22:5n3	7,77±0,72	10,61±2,47	7,90±1,63	8,67±0,55	8,07±1,69	7,11±0,50	7,13±1,39	6,73±1,17	10,36±3,72	
	C22:6n3	209,94±34,76	173,76±0,93	170,12±15,89	172,88±17,41	176,34±33,94	186,69±17,67	160,34±15,16	147,78±18,35	178,61±13,49	
Totales		562,69±1,33	583,80±13,06	549,93±31,82	562,56±59,47	500,45±73,87	495,71±43,07	504,06±67,93	523,08±27,68	569,73±40,90	

Tabla 4.4.6: Cuantificación (mg FAME/g grasa) del perfil de los ácidos grasos esterificados en merluza congelada a -80 °C durante 150 semanas mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama aplicando previamente una metilación básica

Grupo	Ac. Grasos	Tiempo (Semanas de conservación)			
		1	24	106	150
Saturados	C12:0	0,24±0,02	0,25±0,05	0,22±0,01	0,25±0,07
	C14:0	16,71±3,01	17,47±0,40	18,43±1,62	18,09±4,04
	C15:0	2,65±0,52	2,65±0,12	2,63±0,11	2,86±0,67
	C16:0	108,33±10,50	119,23±6,63	112,91±3,16	118,27±11,65
	C17:0	7,59±1,37	7,00±0,59	7,80±1,37	7,94±0,41
	C18:0	24,11±2,94	26,10±0,60	27,03±3,16	27,51±3,12
	C20:0	1,37±0,52	1,08±0,04	1,15±0,20	1,42±0,41
Monoinsaturados	C14:1	0,64±0,14	0,54±0,08	0,60±0,02	0,94±0,50
	C16:1	26,68±3,10	27,38±2,53	25,24±3,31	27,75±2,68
	C18:1n9c	84,24±12,88	93,57±13,28	83,42±13,42	92,20±12,29
	C18:1n7c	20,46±2,88	20,74±3,00	18,90±3,41	21,17±3,09
	C20:1	34,72±7,77	32,29±3,86	43,81±1,72	39,08±10,17
Poliinsaturados	C24:1	7,47±1,47	7,32±0,59	7,07±1,00	7,47±0,21
	C18:2n6c	6,88±1,79	6,91±0,85	7,66±1,06	7,29±1,28
	C18:3n6	0,50±0,10	0,35±0,15	0,47±0,27	0,59±0,26
	C18:3n3	3,55±0,91	3,21±0,57	4,04±1,01	3,49±1,06
	C20:2n6	2,03±0,70	1,95±0,13	1,84±0,17	1,97±0,51
	C20:3n6	0,72±0,35	0,61±0,01	0,70±0,02	0,70±0,10
	C20:4n6	8,54±1,29	9,15±0,48	8,44±0,82	9,54±1,58
	C20:5n3	41,51±4,47	44,79±0,78	42,17±3,09	46,80±7,12
	C22:5n3	9,38±2,39	8,68±0,36	10,01±2,15	9,98±1,71
	C22:6n3	176,28±24,09	173,74±4,06	184,09±12,81	184,98±28,50
Totales	Totales	584,60±76,27	605,00±29,36	608,64±22,88	630,31±73,98

A altas temperaturas de conservación (-10 y -20 °C) la cantidad de ácidos grasos esterificados disminuyó a medida que aumentó el tiempo de conservación. Esta tendencia parecía mas clara en los grupos de ácidos grasos poliinsaturados. Sin embargo a -30 °C sólo se pudo apreciar esta tendencia para ciertos ácidos grasos como C22:6n3 pero fue menos pronunciada que a temperaturas más altas. En la tabla 4.4.7 se muestra el análisis de la varianza en función del tiempo de conservación para cada temperatura en cada grupo de ácidos grasos. A -10 °C las diferencias fueron significativas en C14:0, C15:0, C20:1, C24:1 y C18:3n3; a -20 °C en C12:0, C17:0, C18:0, C24:1 y C22:6n3 también existieron diferencias significativas; a -30 °C hubo diferencias significativas en muchos de los ácidos grasos en todos los grupos (tabla 4.4.7). A -80 °C, en cambio no existieron diferencias en función del tiempo de conservación ($p>0,05$). El análisis de la varianza en función de la temperatura mostró que existían diferencias significativas en la mayoría de los ácidos grasos con independencia de su grado de saturación (tabla 4.4.8).

Tabla 4.4.7: Análisis de la varianza de los grupos de ácidos grasos en función del tiempo de conservación para cada temperatura estudiada

Grupo	Ácido graso	-10 °C	-20 °C	-30 °C	-80 °C
Saturados	C12:0	ns	*	ns	ns
	C14:0	***	ns	***	ns
	C15:0	*	ns	ns	ns
	C16:0	ns	ns	ns	ns
	C17:0	ns	**	***	ns
	C18:0	ns	*	ns	ns
	C20:0	ns	ns	ns	ns
Monoinsaturados	C14:1	ns	ns	ns	ns
	C16:1	ns	ns	**	ns
	C18:1n9c	ns	ns	**	ns
	C18:1n7c	ns	ns	**	ns
	C20:1	**	ns	**	(lim)
	C24:1	*	**	ns	ns
Poliinsaturados	C18:2n6c	ns	ns	***	ns
	C18:3n6	ns	ns	ns	ns
	C18:3n3	**	ns	**	ns
	C20:2n6	ns	ns	**	ns
	C20:3n6	ns	ns	ns	ns
	C20:4n6	ns	ns	ns	ns
	C20:5n3	ns	ns	ns	ns
	C22:5n3	ns	ns	**	ns
	C22:6n3	ns	*	*	ns

Donde ns = no significativo, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ y *** = $p < 0,01$

Tabla 4.4.8: Análisis de la varianza de los ácidos graso obtenidos en función de la temperatura de conservación con independencia del grupo de ácidos grasos

Grupo	Ácido graso	Temperatura
Saturados	C12:0	ns
	C14:0	**
	C15:0	ns
	C16:0	**
	C17:0	*
	C18:0	**
	C20:0	ns
Monoinsaturados	C14:1	ns
	C16:1	*
	C18:1n9c	**
	C18:1n7c	***
	C20:1	***
	C24:1	ns
Poliinsaturados	C18:2n6c	ns
	C18:3n6	ns
	C18:3n3	**
	C20:2n6	**
	C20:3n6	ns
	C20:4n6	***
	C20:5n3	**
	C22:5n3	ns
	C22:6n3	**

Donde ns= no significativo, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ y *** = $p < 0,01$

Detección y evolución del perfil de los ácidos grasos libres.- Los ácidos grasos libres se determinaron por la diferencia entre los ácidos grasos detectados por metilación ácida y metilación básica. La interpretación de los resultados se realizó tomando los valores medios por semana de congelación para cada temperatura. Para ver la estructura de los datos se realizó un análisis por componentes principales. Se utilizaron los datos en $\mu\text{moles FAME/g grasa}$ ya que los valores medios proporcionaron errores estándar más bajos. La tabla 4.4.9 muestra que se requieren 4 PC para explicar el 90 % de la varianza. En el primer componente principal que explicó el 74,6 % de la varianza, se extrajeron tanto ácidos grasos saturados, como mono o poliinsaturados (tabla 4.4.10). La figura 4.4.1 muestra la relación del primer PC con la temperatura y el tiempo de conservación. Los resultados reflejan una clara dependencia de estos resultados con la temperatura y el tiempo de conservación lo que fue compatible con lo obtenido en el apartado 4.3 para otros parámetros como resistencia a la cizalladura y capacidad de retención de agua.

Tabla 4.4.9: Varianza explicada acumulada en % de los PC obtenidos a través de los ácidos grasos libres metilados (todos, saturados, monoinsaturados y poliinsaturados) usando cromatografía de gases FID (μ moles FAME /g grasa) provenientes de la hidrólisis de lípidos en músculo de merluza conservada a -10, -20, -30 y -80 °C

Componentes	Varianza explicada acumulada (%)			
	Todos los ác. grasos	Ác. grasos saturados	Ác. grasos monoinsaturados	Ác. grasos poliinsaturados
1	75	72	87	78
2	81	86	95	88
3	86	96	98	97
4	90	98	99	98
5	93	99	100	99
6	95	100	-	100
7	96	-	-	-
8	97	-	-	-
9	98	-	-	-
10	99	-	-	-
11	100	-	-	-

Tabla 4.4.10: Pesos de los tres primeros PC obtenidos a través de los ácidos grasos libres metilados (μ moles FAME /g grasa) provenientes de la hidrólisis de lípidos en músculo de merluza conservada a -10, -20, -30 y -80 °C usando cromatografía de gases FID

Ácidos grasos	Componentes		
	1	2	3
C12:0	0,049	-0,725	0,289
C14:0	0,226	0,005	-0,056
C14:1	0,169	-0,170	0,448
C15:0	0,211	-0,212	0,168
C17:0	0,237	0,041	-0,021
C16:0	0,237	0,069	-0,020
C16:1	0,233	0,065	-0,001
C17:0	0,237	0,029	-0,013
C18:0	0,232	0,051	0,000
C18:1n9c	0,211	-0,055	0,062
C18:1n7c	0,239	0,013	-0,037
C18:2n6c	0,085	0,211	0,604
C18:3n6	0,091	-0,394	-0,293
C20:0	0,231	-0,044	-0,105
C18:3n3	0,232	0,048	-0,132
C20:1	0,197	-0,110	-0,362
C20:2n6	0,101	0,303	0,230
C20:3n6	0,235	0,100	-0,002
C20:4n6	0,235	0,083	-0,105
C20:5n3	0,229	-0,180	0,052
C22:6n3	0,220	0,102	-0,010
Total	0,235	0,108	-0,015

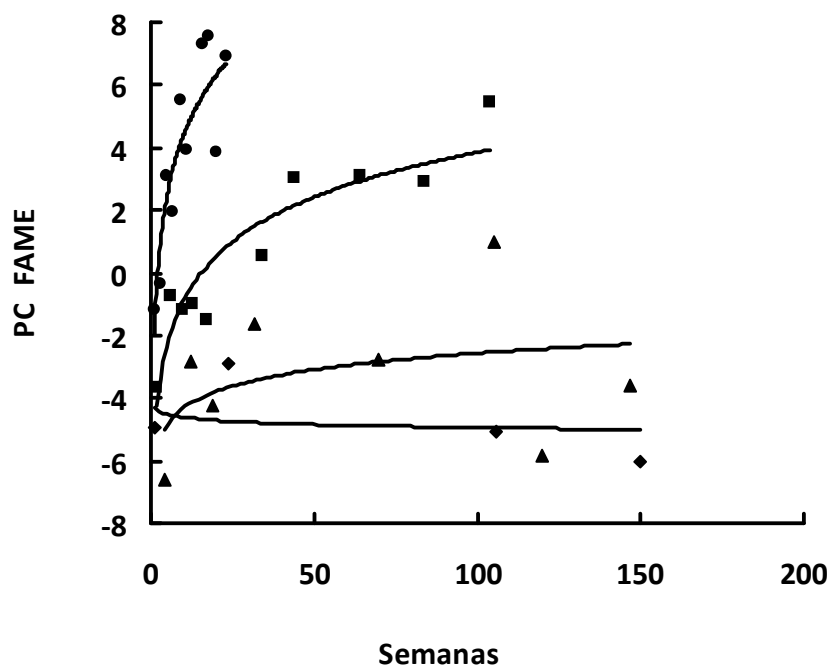


Figura 4.4.1: PC1 de los ácidos grasos libres metilados usando cromatografía de gases FID (μ moles FAME /g grasa) provenientes de la hidrólisis de lípidos en merluza conservada a -10 °C (●), -20 °C (■), -30 °C (▲) y -80 °C (◆). Para la realización del PCA, se usaron los valores resultantes de la diferencia entre los datos obtenidos mediante metilación total de ácidos grasos (método ácido) menos los datos de la metilación de los ácidos grasos esterificados (método básico)

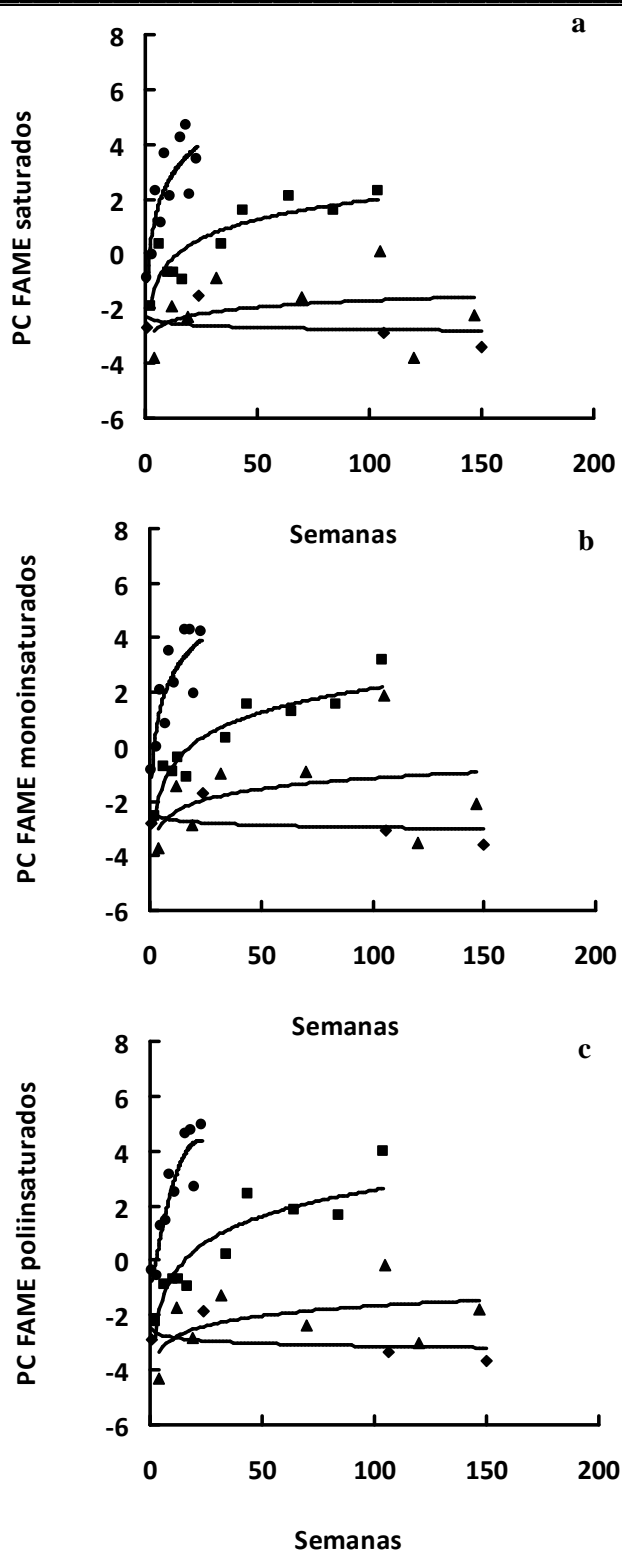


Figura 4.4.2: PC1 de los ácidos grasos libres metilados usando cromatografía de gases FID (μmoles FAME /g grasa) provenientes de la hidrólisis de lípidos en merluza conservada a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (●), $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (■), $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (▲) y $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (◆). FAME saturados (a), monoinsaturados (b) y poliinsaturados (c). Para la realización del PCA, se usaron los valores resultantes de la diferencia entre los datos obtenidos mediante metilación total de ácidos grasos (método ácido) menos los datos de la metilación de los ácidos grasos esterificados (método básico)

Con objeto de ver posibles diferencias en función del grado de saturación, el análisis por componentes principales se realizó para cada grupo de ácidos grasos (saturados, monoinsaturados y poliinsaturados) y las figuras 4.4.2 a-c muestran la relación del primer PC en función del tiempo y la temperatura para cada caso. En general, los valores de los ácidos grasos libres saturados, insaturados o poliinsaturados tenían tendencia a aumentar a lo largo del tiempo de conservación en congelación a temperaturas de -10 y -20 °C. No se pudieron observar unas tendencias claras a -30 y a -80 °C. No se observaron diferencias apreciables en función del grado de saturación por lo que el resto de los análisis se realizaron con los ácidos grasos libres en conjunto.

Las figuras 4.4.3 y 4.4.4, muestran la suma de todos los ácidos grasos libres (en mg FAME/g grasa y micromoles FAME/g grasa respectivamente) a lo largo del tiempo de conservación en congelación medido en semanas. En general, los trabajos consultados utilizan métodos más convencionales para medir el contenido de ácidos grasos libres. Por ejemplo el método de Lowry & Tinsley, (1976) mediante determinaciones colorimétricas con cupriacetato y piridina. Aubourg & Medina, (1999) utilizando este método colorimétrico en eglefino y bacalao conservado durante un año a -10 °C y -30 °C obtuvieron una tendencia a lo largo del tiempo similar a la obtenida en este trabajo. Esta misma tendencia la encontraron estos autores posteriormente en merluza conservada durante 12 meses a -10 y -30 °C (Aubourg et al. 2007). Por su parte, Sánchez-Alonso et al. (2012), mediante estos métodos colorimétricos y espectroscópicos también detectaron un incremento del porcentaje de ácidos grasos libres en merluza congelada a -10 °C sin observar cambios en merluza congelada a -80 °C durante 23 semanas. Wu et al. (2014) también obtuvieron la misma tendencia en carpa congelada a -10, -20 y -30 °C durante 16 semanas. Sin embargo las diferencias

encontradas entre -10 y -20 °C fueron menores a lo largo del tiempo en comparación con los resultados obtenidos en el experimento actual. Estas concordancias podrían indicar la adecuación de la determinación de ácidos grasos libres por medidas colorimétricas, o bien por métodos espectroscópicos sin tener la necesidad de recurrir a otras técnicas como la ensayada en este apartado.

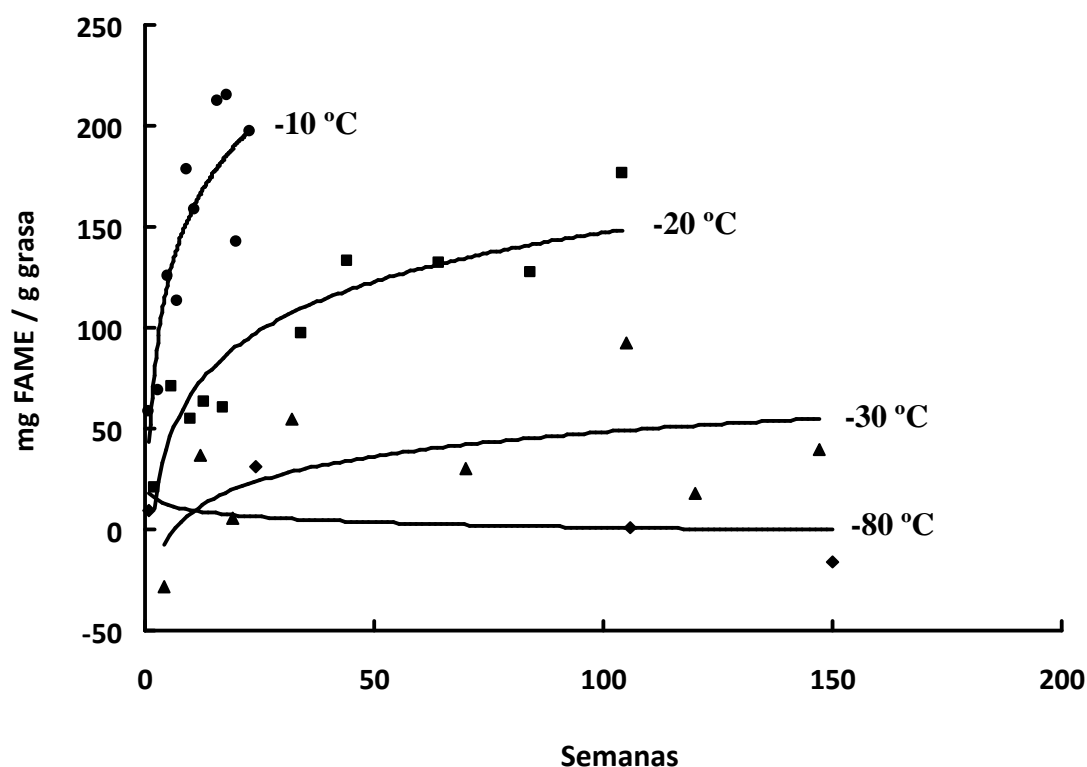


Figura 4.4.3: Evolución de los ácidos grasos libres metilados usando cromatografía de gases FID (mg FAME /g grasa). Estos ácidos grasos provienen de la hidrólisis de lípidos en merluza conservada a distintos tiempos de conservación (semanas) a -10, -20, -30 y -80 °C. Se usaron los valores resultantes de realizar la diferencia entre los datos obtenidos mediante metilación total de ácidos grasos (método ácido) menos los datos de la metilación de los ácidos grasos esterificados (método básico). Cada dato corresponde a la suma total de todos los ácidos grasos detectados

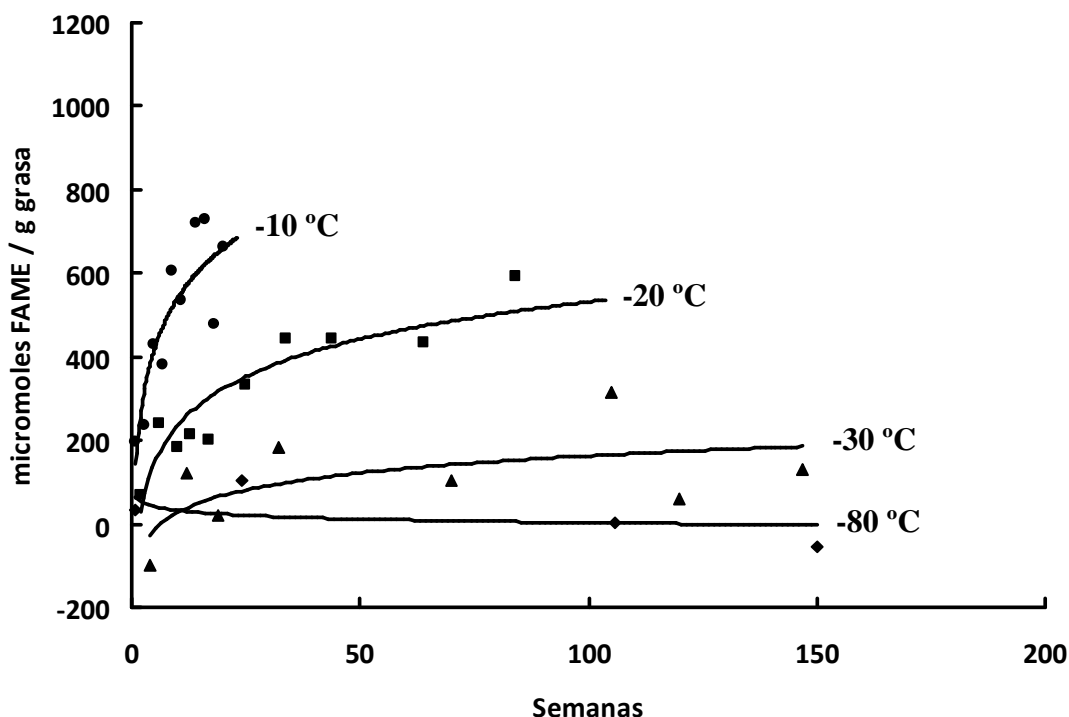


Figura 4.4.4: Evolución de los ácidos grasos libres metilados usando cromatografía de gases FID (μ moles FAME / g grasa). Estos ácidos grasos provienen de la hidrólisis de lípidos en merluza conservada a distintos tiempos de conservación (semanas) a -10, -20, -30 y -80 °C. Se usaron los valores resultantes de realizar la diferencia entre los datos obtenidos mediante metilación total de ácidos grasos (método ácido) menos los datos de la metilación de los ácidos grasos esterificados (método básico). Cada dato corresponde a la suma total de todos los ácidos grasos detectados

4.4.3.- Modelización cinética de los ácidos grasos libres

La dependencia con la temperatura y el tiempo de conservación permitió también en este caso abordar una modelización cinética de los ácidos grasos libres. Como el comportamiento de los datos fue equivalente en las dos unidades utilizadas sólo se presenta la modelización con los valores obtenidos en mg FAME/g de grasa. Los valores iniciales (A_0) en el caso de la modelización de orden cero y de orden 1 y los valores (A_{eq} , A_1) en el caso de la modelización por conversión fraccional fueron diferentes debido al cambio de unidades.

La tabla 4.4.11 muestra los parámetros del ajuste cinético de los datos. Se observó que la ecuación de conversión fraccional $[A = A_{eq} + A_l \exp(-kt)]$ se ajustaba mejor a la evolución de los datos con unas R^2 más altas. El ajuste fue bueno a altas temperaturas de conservación y existió una falta de ajuste a -30 y -80 °C. Los resultados de las regresiones no lineales de los modelos de orden cero $\{A = A_0 - k_{ref} t \exp[-B(1/T - 1/T_{ref})]\}$, de orden uno $\{A = A_0 \exp[-k_{ref} t \exp(-B(1/T - 1/T_{ref}))]\}$ y con el modelo de conversión fraccional $\{A = A_{eq} + A_l \exp[-k_{ref} t \exp(-B(1/T - 1/T_{ref}))]\}$ (tabla 4.4.12 y figura 4.4.5), utilizando 253 °K como temperatura de referencia (T_{ref}) indicaron que el mejor modelo con una $R^2 = 0,87$ fue el de conversión fraccional aunque existió cierta falta de ajuste (figura 4.4.5).

Tabla 4.4.11: Parametros de la regresión no lineal (\pm error estándar) de las ecuaciones de orden cero (A_0 - $A = kt$), primer orden ($A_0/A = \exp(kt)$) y modelo de conversión fraccional ($A = A_{eq} + A_I \exp(-kt)$) de la evolución de los ácidos grasos libres (mg FAME/g materia grasa) de filetes de merluza almacenados a -10, -20, -30 and -80 °C

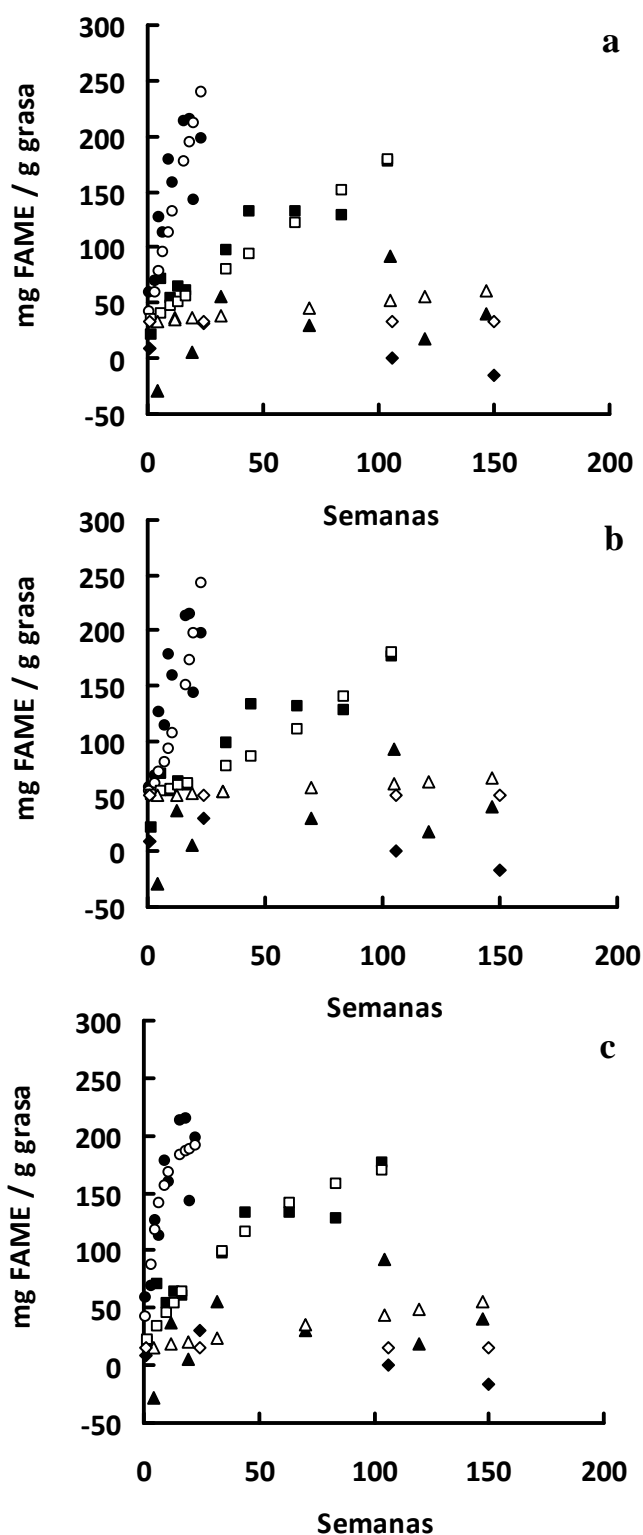
		TEMPERATURA (°C)			
Modelo cinético		-10 (N=11)	-20 (N=11)	-30 (N=9)	-80 (N=4)
Orden cero	A_0	80,14 \pm 20,62	46,47 \pm 8,86	12,70 \pm 19,20	22,28 \pm 10,66
	k	5,93 \pm 1,54	1,24 \pm 0,17	0,29 \pm 0,23	-0,23 \pm 0,12
	R^2	0,61	0,85	0,07	0,49
Orden 1	A_0	96,28 \pm 18,26	57,91 \pm 8,49	19,55 \pm 16,44	19,67 \pm 18,01
	k	0,04 \pm 0,01	0,01 \pm 0,002	0,01 \pm 0,01	-0,02 \pm 0,04
	R^2	0,52	0,78	0,02	0,04
Modelo de conversión fraccional	A_{eq}	201,26 \pm 26,22	184,62 \pm 44,04	45,13 \pm 14,03	22,86 \pm 28,64
	A_I	-177,68 \pm 34,35	-153,72 \pm 38,15	-114,43 \pm 81,98	-3,10 \pm 18,98
	k	0,15 \pm 0,08	0,018 \pm 0,011	0,12 \pm 0,13	-0,02 \pm 0,04
	R^2	0,74	0,87	0,29	0,26

A (mg FAME / g materia grasa) es la cantidad de AGL y k es la constante de velocidad (Semanas⁻¹). A_0 es el valor inicial de la cantidad de AGL. Para el modelo de conversión fraccional, A_{eq} corresponde al valor residual de la cantidad de AGL, y A_I es la diferencia entre el valor inicial y el valor residual. R^2 es el coeficiente de determinación ajustado. Los datos fueron calculados con la media de los valores por tiempo y temperatura de conservación.

Tabla 4.4.12: Parametros de la regresión de la evolución de los ácidos grasos libres (mgFAME/g materia grasa) (\pm standard error) de filetes de merluza almacenados a -10, -20, -30 and -80 °C

Modelo	Estimación de parámetros	
Orden cero	A_0	$32,54 \pm 8,22$
	k_{ref}	$1,40 \pm 0,24$
	B	12366 ± 1113
	R^2	0,76
Orden 1	A_0	$50,54 \pm 8,27$
	k_{ref}	$0,01 \pm 0,00$
	B	11460 ± 1088
	R^2	0,62
Modelo de conversion fraccional	A_{eq}	$194,27 \pm 16,03$
	A_1	$-179,62 \pm 16,47$
	k_{ref}	$0,019 \pm 0,005$
	B	14671 ± 1322
	R^2	0,87

Ajuste para un orden cero ($A = A_0 + k_{ref} t \exp [-B(1/T - 1/T_{ref})]$), primer orden ($A = A_0 \exp [-k_{ref} t \exp (-B(1/T - 1/T_{ref}))]$) y modelo de conversión fraccional ($A = A_{eq} + A_1 \exp [-k_{ref} t \exp (-B(1/T - 1/T_{ref}))]$) con $T_{ref} = 253$ °K. A es el valor de AGL, k_{ref} es la constante de velocidad (Semanas⁻¹) a la T_{ref} establecida B es una constante, t es el tiempo de conservación (semanas) y T la temperatura absoluta (K). A_0 es el valor inicial de AGL. Para el modelo de conversión fraccional, A_{eq} corresponde a el valor residual de AGL, y A_1 es la diferencia entre el valor inicial y el residual. R^2 es el coeficiente de determinación ajustado. N=96 individuos



Figuras 4.4.5: Valores predichos y observados (símbolos vacíos y llenos respectivamente) de la cantidad de AGL en función del tiempo de conservación de filetes conservado a -10 °C (círculo), -20 °C (cuadrado), -30 °C (triángulo), y -80 °C (rombo). a) representa la cinética de orden 0, b) la cinética de primer orden y c), la cinética del modelo de conversión fraccional

La evolución de la hidrólisis de lípidos se ha modelizado en carpa (Wu et al. 2014). Las diferencias encontradas por estos autores a altas temperaturas de conservación (-10 y -20° C) fueron menos pronunciadas que las diferencias encontradas en el presente trabajo probablemente debido a la especie ya que la pauta de hidrólisis encontrada en merluza por otros autores (Aubourg et al. 2007) es comparable a la del presente trabajo.

Wu et al. (2014), indicaron que el mejor modelo para interpretar la dependencia de la cantidad de ácidos grasos libres con la temperatura en carpa congelada a -10, -20 y -30 °C durante 16 semanas se obtuvo con una cinética de orden uno, aunque no ensayaron el modelo de conversión fraccional. Estos autores obtuvieron una falta de ajuste del modelo de ácidos grasos libres, y ésta fue superior que la encontrada para otros parámetros como la determinación de la actividad ATPásica.

Los parámetros de este apartado son similares a los encontrados en el 4.3 para resistencia a la cizalladura y aunque exista una falta de ajuste del modelo (figura 4.4.5), los resultados muestran la misma tendencia por lo que en principio, los resultados de hidrólisis de lípidos podrían utilizarse en conjunto con los indicadores del apartado anterior para tener una estimación más robusta de la calidad de merluza. Los resultados de las secciones 4.3 y 4.4 permiten establecer comparaciones entre indicadores físico-químicos y espectroscópicos en caso de que se encontraran pautas similares de deterioro. Careche et al. (2015) obtuvieron unos valores del parámetro B en torno a 13580 ± 350 por modelización cinética de lípidos de merluza mediante espectroscopía FTIR también cercanos a los parámetros obtenidos en esta sección. Así la dependencia con la temperatura en los casos vistos anteriormente parece seguir un patrón similar. En

este experimento se ha monitorizado la hidrólisis de lípidos de merluza conservada en congelación utilizando técnicas cromatográficas. Los resultados indicaron una dependencia de esta hidrólisis con la temperatura y el tiempo que siguió un modelo de conversión fraccional cuyos parámetros estuvieron en los mismos rangos de magnitud de otros trabajos previos en esta especie. Estos resultados sugieren que la evolución de los procesos lipolíticos del músculo sigue un patrón similar a otros procesos degradativos importantes en la estimación de la calidad de esta especie.

4.5.- EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS OBTENIDOS MEDIANTE RELAXOMETRÍA ^1H RMN DE BAJO CAMPO EN MERLUZA CONSERVADA A -10, -20, -30, Y -80 °C. OBTENCIÓN DE MODELOS CINÉTICOS

Después de comprobar que la relaxometría ^1H RMN de bajo campo guarda una relación clara con el tiempo de conservación y con otros parámetros físico-químicos, (apartado 4.2), se prosiguió el estudio incluyendo la temperatura de conservación como factor adicional en las condiciones expuestas en el experimento C (tabla 2.1 y figura 3.1.4). Con ello se abordó el objetivo 4 de esta Tesis.

4.5.1.- Análisis elementales y pH

Los resultados de los análisis elementales y pH son los mismos que los obtenidos en el apartado 4.3.1 ya que se utilizó la misma materia prima.

4.5.2.- Evolución a lo largo del tiempo de los parámetros de relaxometría ^1H RMN de bajo campo en merluza conservada a 10, -20, -30, y -80 °C

Efecto de la congelación.- La figura 4.5.1 muestra los perfiles CONTIN iniciales a las temperaturas de conservación estudiadas así como un perfil de una muestra de merluza sin congelar. En este último caso se observó una banda mayoritaria a tiempos de relajación correspondientes a T_{21} , mientras que la banda correspondiente a T_{22} no estaba presente, tal y como se observó en la sección 4.2.3. También en este experimento en músculo conservado a -80 °C la banda T_{21} se ensanchó y su amplitud máxima

disminuyó respecto al músculo fresco y al igual que en merluza sin congelar no se observó la banda T_{22} . Al aumentar la temperatura se incrementó tanto el ensanchamiento como la disminución de la intensidad máxima de la banda T_{21} observada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se observó la aparición de T_{22} . Asimismo, el máximo de la banda T_{21} estuvo en valores que corresponden a protones de movilidad más restringida a medida que la temperatura de conservación fue más alta.

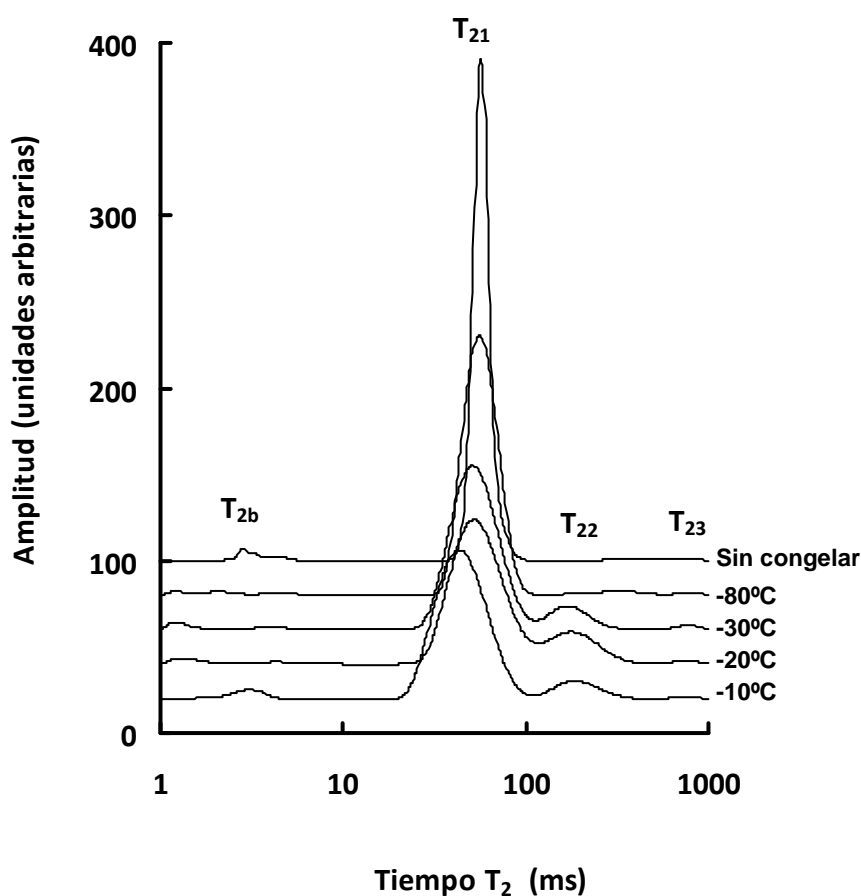


Figura 4.5.1: Perfiles del análisis CONTIN de filetes de merluza sin congelar y de filetes descongelados a cada temperatura objeto de análisis en los tiempos iniciales de conservación en congelación

Las diferencias entre pescado descongelado y fresco encontradas en esta Tesis se habían observado previamente en un experimento que abordaba el estudio de diferentes velocidades de congelación (Sánchez-Alonso et al. 2014). En ese trabajo, siguiendo la

interpretación de Belton (Belton et al. 1988; Belton 2011) basada en estudios en sistemas modelo desarrollados para biopolímeros en agua, sugirieron que la aparición de T_{22} en producto descongelado podía responder a los cambios morfológicos resultantes de los procesos que ocurren durante la congelación y descongelación del pescado. La ausencia de esta banda en las muestras conservadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ puede explicarse si se asume que los cambios morfológicos son leves a esta temperatura debido a la formación de cristales de hielo de pequeño tamaño. Por ejemplo Belton et al. (1988) en geles de agarosa descongelados que habían sido congelados en nitrógeno líquido no encontraron una banda extra cuando el tamaño de los cristales de hielo fue menor de $3\text{-}4\text{ }\mu\text{m}$. En la misma línea, Sánchez-Alonso et al. (2014) observaron en ciertos filetes de merluza descongelada la ausencia de esta banda cuando congelaron el pescado en un congelador criogénico con nitrógeno líquido.

Modificación de los parámetros de relaxometría ^1H RMN de bajo campo en función de tiempo y temperatura de conservación.- La figura 4.5.2 refleja la evolución de las curvas de relajación descritas por T_2 a las temperaturas de congelación estudiadas. Las diferencias en función del tiempo son más acusadas a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, siendo menores a medida que disminuye la temperatura de conservación.

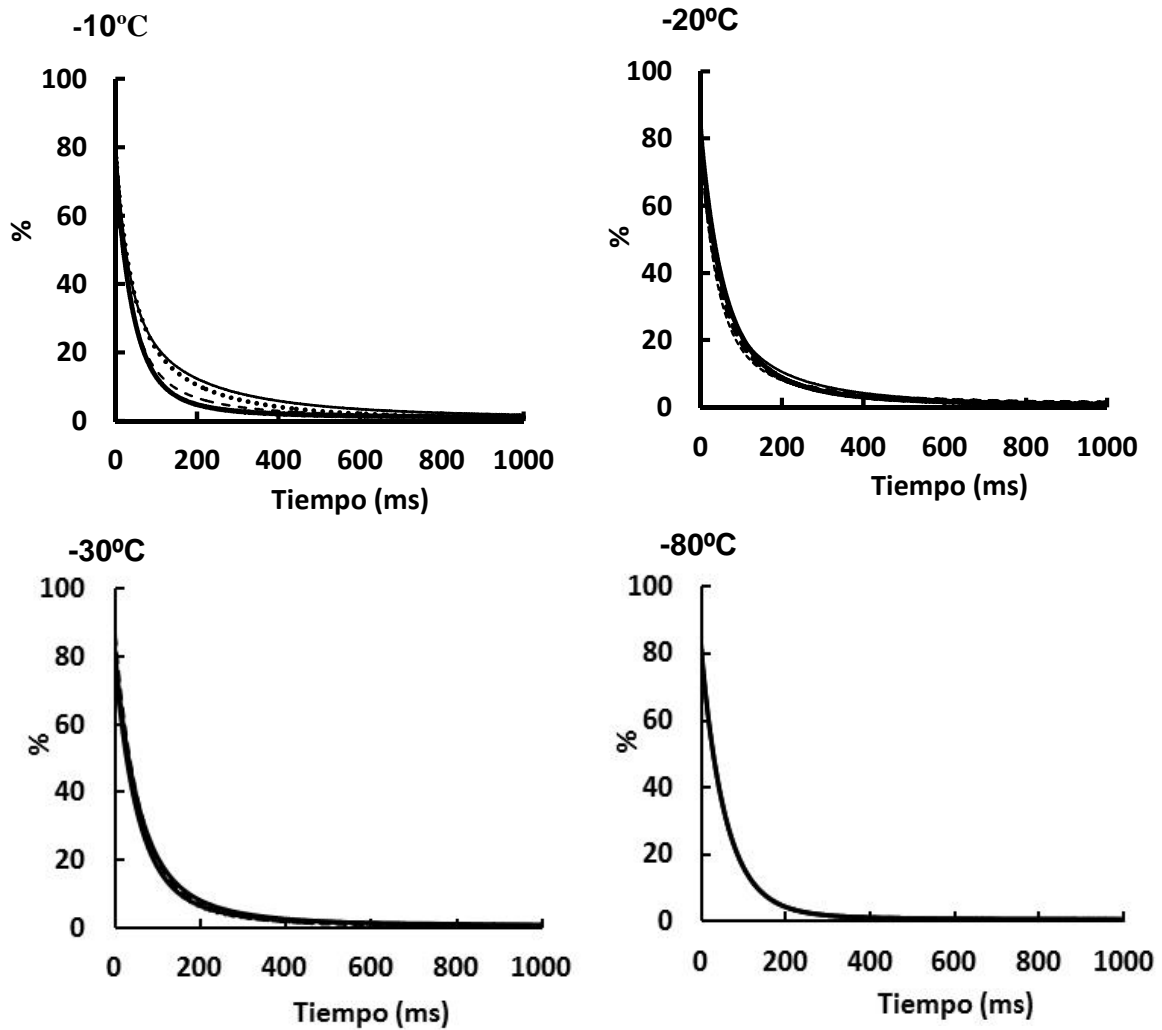


Figura 4.5.2: Curvas de relajación de T_2 de filetes almacenados a -10, -20 y -30 °C. Cada línea representa la curva de relajación de una semana de análisis. Las curvas con líneas gruesas continuas corresponden a los tiempos de análisis iniciales, las curvas con líneas discontinuas representan la relajación a tiempos iniciales avanzados, las líneas punteadas representan la relajación a tiempos medios y las líneas finas continuas, indican la relajación a tiempos finales

Los análisis biexponenciales que resuelven las curvas T_2 (figura 4.5.3) indicaron que en todos los parámetros medidos (T_{21} , T_{22} , A_{21} , A_{22}) existieron cambios a lo largo del tiempo de conservación. A -10 °C y a -20 °C, el tiempo y la amplitud del tiempo de relajación intermedio (T_{21} y A_{21} respectivamente) disminuyeron progresivamente mientras que el tiempo T_{22} y su amplitud (A_{22}) aumentaron en estas condiciones. Sin embargo a -30 °C las variaciones fueron menos pronunciadas y a -80 °C éstas no se

produjeron salvo en el tiempo de relajación T_{22} .

También las modificaciones de los perfiles CONTIN a lo largo del tiempo fueron más evidentes a medida que aumentaba la temperatura de conservación (figura 4.5.4). Estos cambios afectaron a abundancias relativas correspondientes a las poblaciones de protones con movilidad intermedia (T_{21}) y alta (T_{22}). La abundancia relativa de T_{21} fue disminuyendo a medida que aumentó el tiempo de conservación y se observó un incremento simultáneo de la abundancia de T_{22} . Asimismo a medida que la temperatura de congelación fue más alta y los tiempos más prolongados, se observó un desplazamiento progresivo de la banda correspondiente a los protones de movilidad intermedia hacia tiempos más bajos. No se ha observado una pauta clara en las bandas T_{2b} y T_{23} .

Los espectros diferencia de los perfiles respecto a la primera semana de congelación para cada temperatura (figura 4.5.5), muestran que a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ existió una disminución progresiva de una población con tiempo de relajación entre los 50 y los 55 ms y un incremento de la proporción de protones con tiempos de relajación entre 23 y 26 ms y entre 140 y 160 ms. A $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ existió una disminución en torno a los 56 ms y los incrementos se encuentran entre 28 y 30 ms y entre 152 y 160 ms. A $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ se observó un aumento de una población en torno a los 35 ms en las primeras semanas de conservación y una reducción de otra población en torno a los 80 ms. A final de la conservación el patrón fue inverso. Las diferencias a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ se consideraron parte del error experimental.

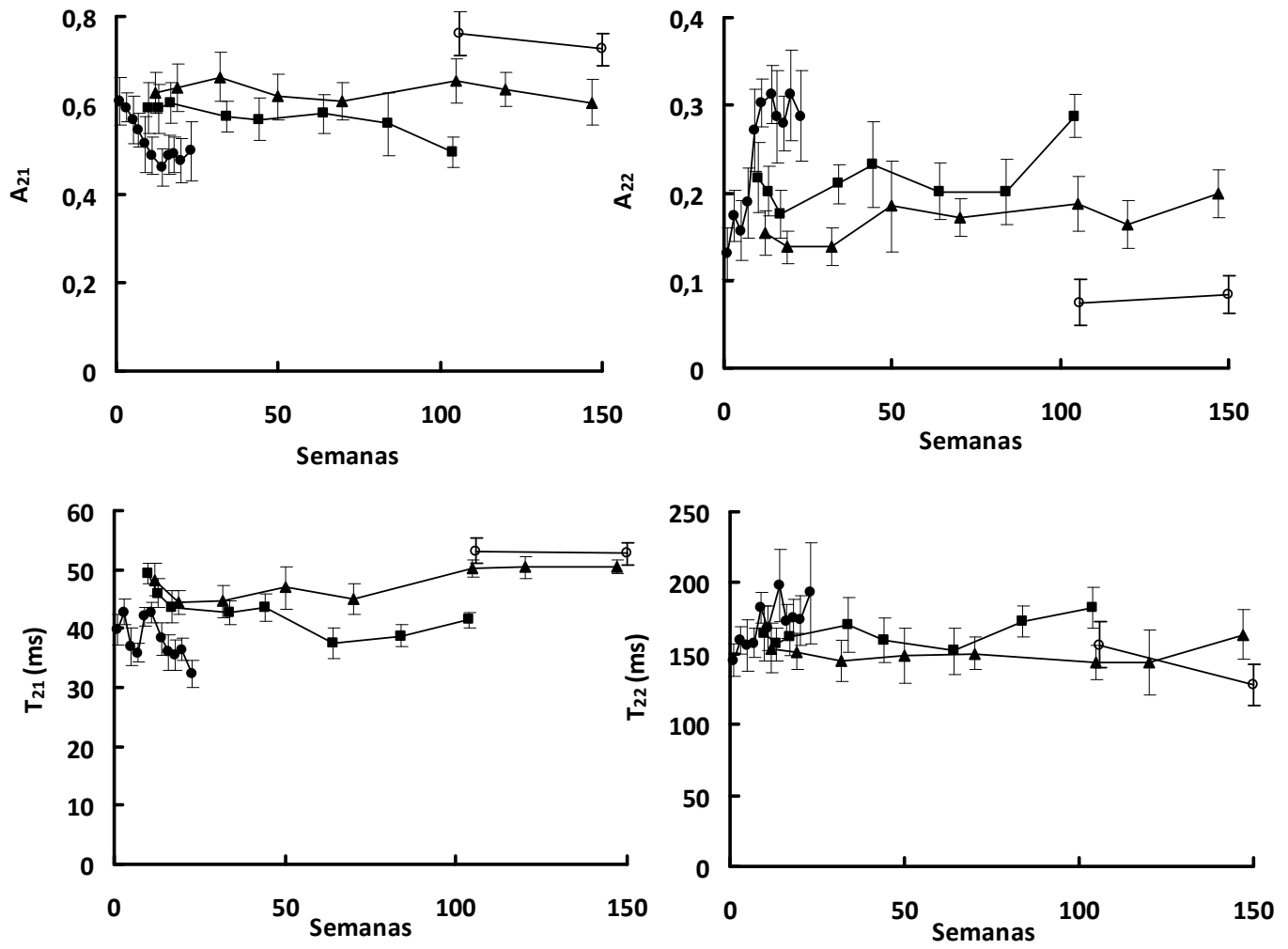


Figura 4.5.3: Evolución de los parámetros espectroscópicos mediante análisis biexponencial de filetes almacenados a -10 °C (●), -20 °C (■), -30 °C (▲) y -80 °C (○). Cada punto representa la media de al menos 15 valores (tres medidas por individuo en 5 individuos)

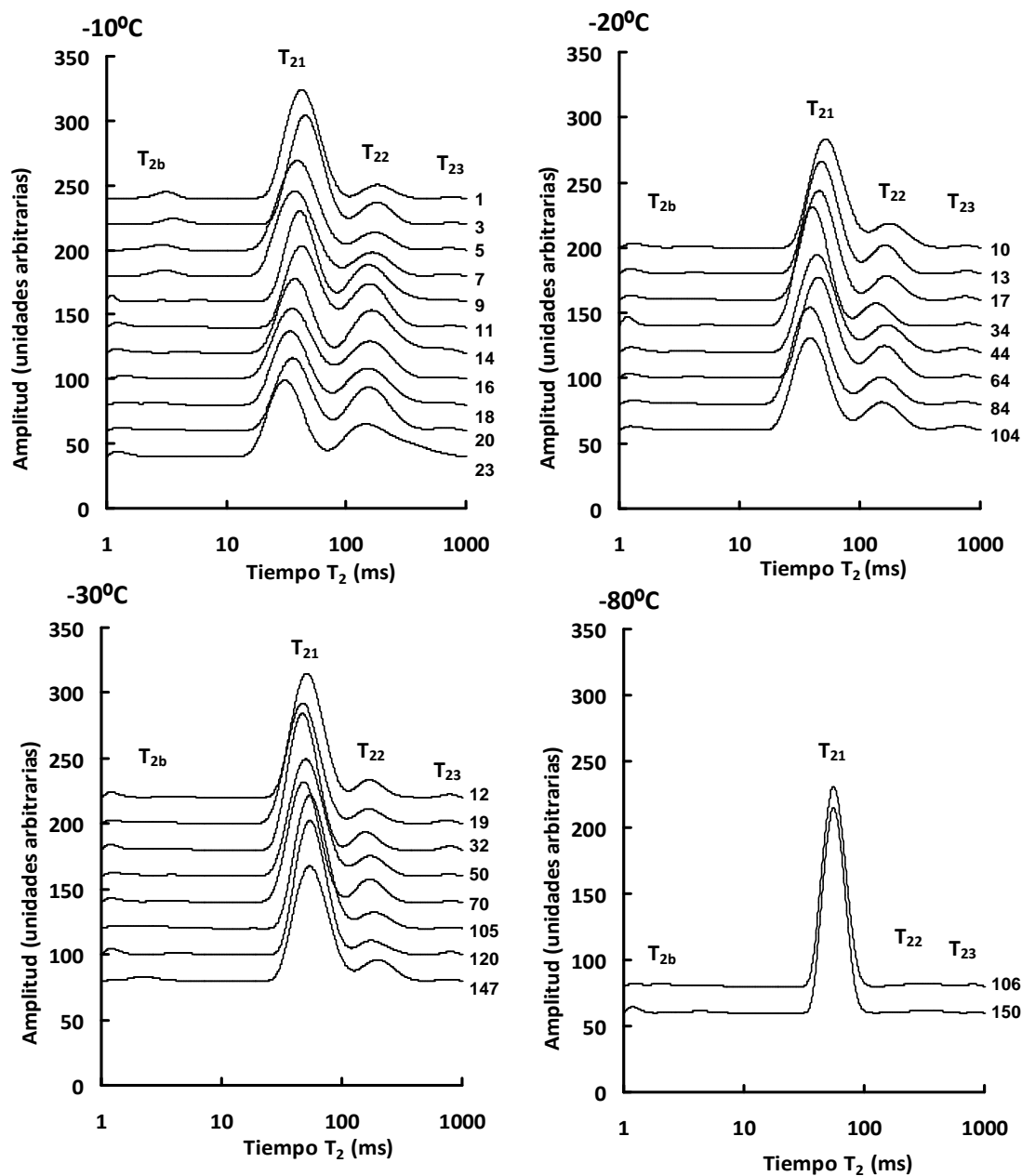


Figura 4.5.4: Análisis CONTIN de los tiempos de relajación de los protones del agua en el músculo de merluza almacenada a -10, -20, -30 y -80 °C. Los números a la derecha de cada gráfica indican el tiempo de conservación medido en semanas

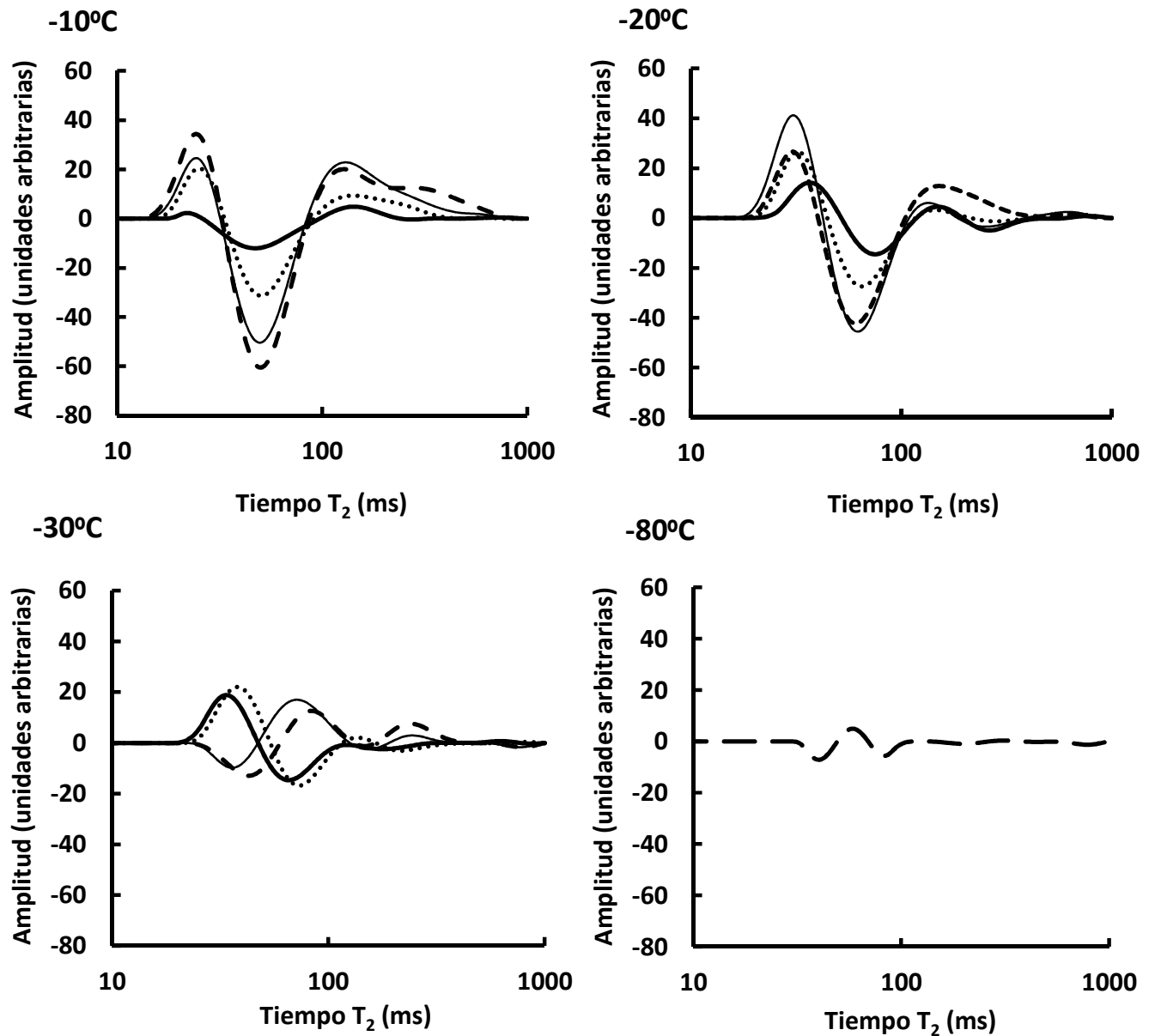


Figura 4.5.5: Espectros diferencia con respecto a la primera semana de conservación de filetes de merluza conservados a -10, -20, -30 y -80 °C. Cada línea indica una semana de congelación y se presentan los espectros diferencia de las semanas iniciales (línea gruesa continua), del tiempo de conservación medio (línea punteada), de semanas posteriores al tiempo medio (línea continua) y de la semana final (línea discontinua)

Los resultados de relaxometría en todos los análisis realizados indican que los cambios en los parámetros espectroscópicos a -10 °C están de acuerdo con los observados en el experimento presentado en la sección 4.2 y con los resultados obtenidos previamente en merluza (Sánchez-Alonso et al. 2014) y en bacalao (Steen & Lambelet, 1997) aunque en ninguno de los casos se realizó una conservación a tiempos que cubrían toda la vida útil del producto ni se utilizaron cuatro temperaturas de conservación.

De acuerdo a la interpretación propuesta por varios autores (Hills et al. 1989; 1990; Belton et al. 2011) la disminución progresiva del tiempo de relajación T_{21} podría deberse a la actuación de varios fenómenos en conjunto. Por un lado podría estar causada por las limitaciones físicas en los movimientos de rotación del agua debidas a la disminución del espacio intramiofibrilar en el músculo descongelado. Además este fenómeno también podría ser compatible con un intercambio químico entre protones del agua y de las proteínas miofibrilares afectadas por la desnaturalización y por la agregación como fue discutido para este sistema por Sánchez-Alonso et al. (2014). Hills et al. (1989) observaron una relajación transversal de los protones más baja en albúmina de suero bovino agregada comparada con la proteína sin agregar que atribuyeron a que las interacciones dipolares entre los protones de las proteínas no eran eficientemente promediadas por los movimientos de rotación, lo que a su vez causa una reducción en los tiempos de relajación de los protones del agua ya que están en rápido intercambio químico con los protones de las proteínas.

El aumento del tiempo de relajación T_{22} observado en el ajuste por biexponenciales no parece ser tan evidente en los resultados obtenidos por el análisis

CONTIN. Como se ha discutido a lo largo de esta Tesis T_{22} es más heterogéneo y por otro lado el análisis biexponencial ajusta los datos a dos términos. Por lo tanto los cambios detectados en T_{22} en el ajuste por biexponenciales pueden deberse al error de incluir otras poblaciones de diferente movilidad en T_{22} . Se ha sugerido que el incremento de la abundancia de T_{22} así como la disminución de la abundancia de T_{21} a lo largo del tiempo puede estar asociado a una migración de agua intramiofibrilar a cristales extracelulares reduciéndose así el agua que se puede rehidratar en el espacio intramiofibrilar, como se describió en la sección 4.2.

En general se observa una dependencia de la temperatura y del tiempo de conservación en los valores obtenidos por relaxometría que sugiere que los parámetros obtenidos por estos métodos podrían utilizarse como indicadores de calidad.

4.5.3- Análisis por componentes principales

El análisis por componentes principales de los datos medios por semana de las curvas de relajación descritas por T_2 entre 12 y 700 ms (Figura 4.5.2) indicó que con 2 PC se explicaba el 99 % de la varianza y la mayor parte de la variabilidad se encontró en PC1 con un 87 % de la varianza total explicada. En la figura 4.5.6 a) se describen las puntuaciones de PC1 vs PC2 y no se observa una separación por temperaturas. Los pesos de los 2 primeros PC están gráficamente representados en la figura 4.5.6 b). Jensen et al. (2002), obtuvieron en músculo de bacalao descongelado y picado un comportamiento de los pesos de los 2 primeros PC similar al de nuestro experimento.

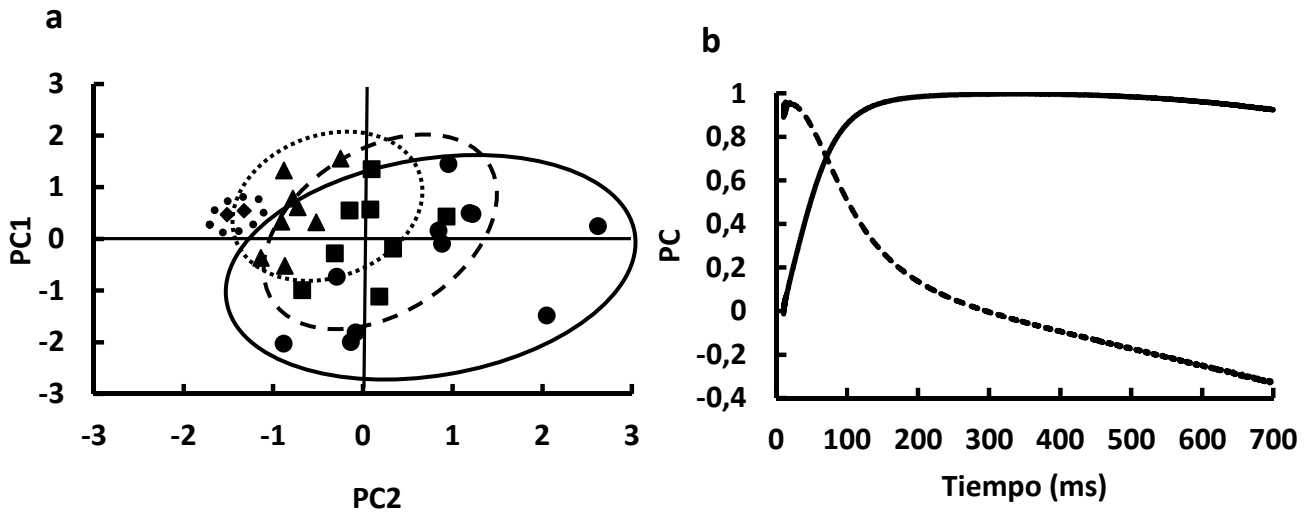


Figura 4.5.6: Análisis por componentes principales de los datos de relaxometría de filetes almacenados a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (\bullet), $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (\blacksquare), $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (\blacktriangle) y $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (\blacklozenge) mediante las curvas T_2 . La figura a indica las puntuaciones enfrentadas de los dos PC que más varianza explican. Cada círculo indica la agrupación de las puntuaciones por temperaturas, donde las temperaturas están agrupadas por círculos: $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, línea continua, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ línea discontinua, $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ punteado fino y $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ punteado grueso. La figura b muestra los pesos de los dos PC frente al tiempo de relajación medido en ms. La línea continua describe el peso del PC1 y la línea discontinua el peso del PC2

El segundo análisis por PCA se realizó con los parámetros obtenidos por medio del análisis biexponencial, utilizando asimismo los datos medios por semana. En este caso se extrajo un PC que explicó el 83 % de la varianza. La tabla 4.5.1 refleja los pesos obtenidos para cada parámetro biexponencial y se observó que las amplitudes de ambos tiempos de relajación son las variables con mayor influencia en el PC.

Tabla 4.5.1: Pesos del componente principal extraído del análisis por componentes principales de los parámetros biexponenciales

Parámetros de T_2	PC 1
T_{21}	-0,82
A_{21}	-0,98
T_{22}	0,90
A_{22}	0,94

Los valores medios por semana utilizando CONTIN se sometieron a análisis por componentes principales en el rango entre los 12 y los 700 ms. Este análisis indicó que 9 componentes explicaban el 99,7 % de la varianza de tal forma que PC1 y PC2

explicaron el 61 y 15 % de ésta respectivamente. Las puntuaciones de PC1 frente al PC2 mostraron la existencia de una fuerte relación con la temperatura de conservación (figura 4.5.7 a). Los pesos del PC1 (figura 4.5.7 b) mostraron que las variables cercanas a 30, 60, 100, 260 y 580 ms tenían un alto valor en este factor. Las tres primeras regiones corresponden a la banda de los protones de movilidad intermedia T_{21} y la cuarta y la quinta región corresponden a la zona de protones de alta movilidad, T_{22} .

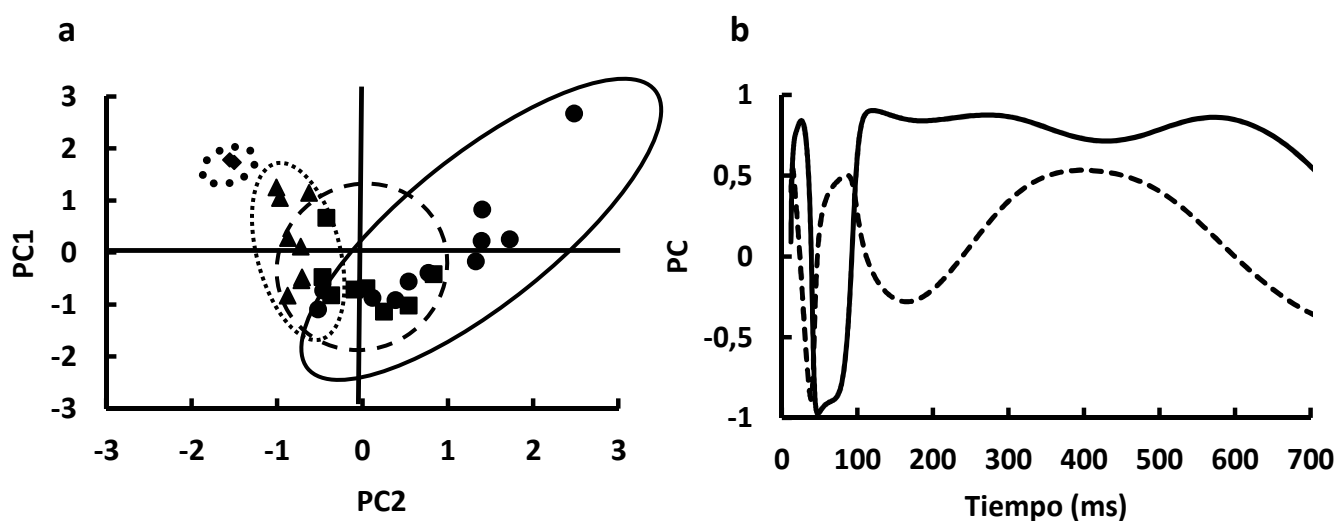


Figura 4.5.7: Análisis por componentes principales de los datos de relaxometría de filetes almacenados a -10 °C (●), -20 °C (■), -30 °C (▲) y -80 °C (◆) mediante análisis CONTIN. La figura a indica las puntuaciones enfrentadas de los dos PC que más varianza explican. Cada círculo indica la agrupación de las puntuaciones por temperaturas, donde -10 °C está representado por un círculo en línea continua, -20 °C, está representado por un círculo en línea discontinua, -30 °C, está representado por un círculo punteado y -80 °C está representado con un círculo punteado grueso. La figura b muestra los pesos de PC1 y PC2 frente al tiempo de relajación medido en ms. La línea continua describe el peso del PC1 y la línea discontinua el peso del PC2

La tabla 4.5.2 resume los datos de varianza explicada acumulada de cada PC en los diferentes análisis y la figura 4.5.8 muestra las puntuaciones del primer PC para cada tipo de análisis de la señal (curva T_2 , parámetros biexponenciales y CONTIN) en función del tiempo de conservación. En estos análisis se observa una relación tiempo-temperatura de estas puntuaciones por lo que se sometió a modelización cinética como se describe en el siguiente apartado.

Tabla 4.5.2: Varianza explicada acumulada en % de los PC de todos los análisis realizados mediante relaxometría ^1H RMN de bajo campo

Componentes	Varianza explicada acumulada (%)		
	Curvas descritas por T_2	Análisis biexponencial	Análisis CONTIN
1	87	83	61
2	99	100	76
3	100	-	87
4	-	-	92
5	-	-	95
6	-	-	97
7	-	-	98
8	-	-	99
9	-	-	100

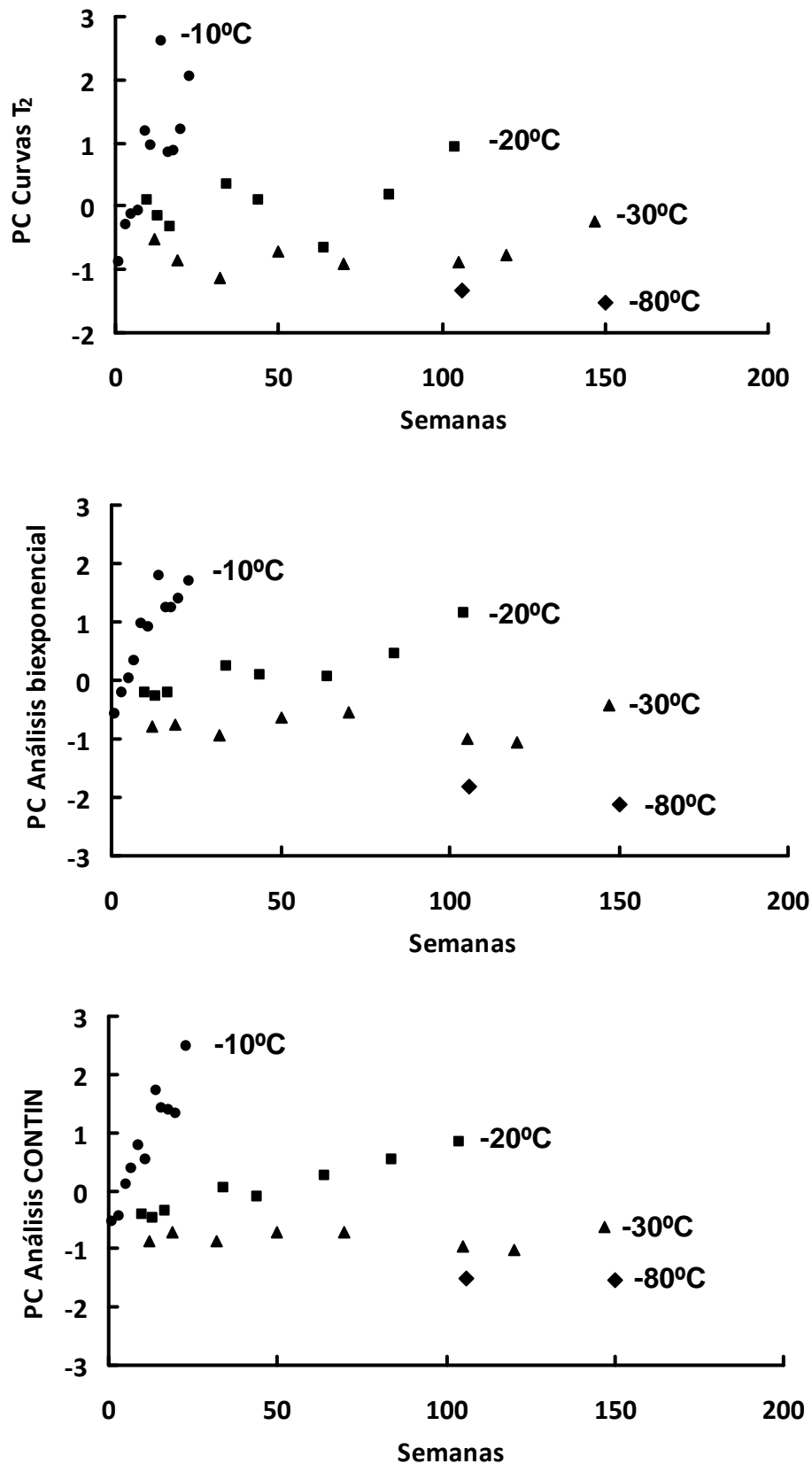


Figura 4.5.8: Relación de las puntuaciones del primer PC obtenido en cada análisis de la señal del tiempo de relajación en función del tiempo de conservación (semanas) de filetes de merluza almacenados a -10 °C (●), -20 °C (■), -30 °C (▲) y -80 °C (◆)

4.5.4.- Modelización cinética de los parámetros de la relaxometría

Las puntuaciones de PC1 obtenido por las curvas T_2 se utilizaron para efectuar la modelización cinética. Los datos para cada temperatura a lo largo del tiempo de conservación se ajustaron a una cinética de orden cero ($A-A_0=kt$) (tabla 4.5.3). En general las cinéticas mostraron un bajo ajuste por lo que se descartó su análisis posterior.

Tabla 4.5.3: Parámetros de la regresión de orden cero (\pm error estándar) ($A_0-A=kt$) del PC1 realizado mediante las curvas de relajación T_2 a partir de filetes de merluza almacenados a -10, -20 y -30 °C

		TEMPERATURA °C		
Modelo cinético		-10 (N=11)	-20 (N=8)	-30 (N=8)
Orden cero	A_0	-0,673±0,421	-0,357±0,290	-1,067±0,176
	k	0,118±0,031	0,007±0,005	0,002±0,002
	R^2	0,61	0,23	0,17

A es la variable respuesta del PC, A_0 es el valor inicial, k es la constante de velocidad medida en semanas⁻¹ y t es el tiempo de conservación medido en semanas. R^2 corresponde al coeficiente de determinación. Los datos están calculados con la media de los valores hallados por tiempo y temperatura de conservación

En segundo lugar se analizaron de manera similar los datos medios obtenidos por análisis biexponencial. Las variables T_{21} , A_{22} y T_{22} , no siguieron una cinética clara con coeficientes de determinación bajos (resultados no mostrados). Sin embargo A_{21} mostró una tendencia lineal que se ajustó a una ecuación de orden cero y en la tabla 4.5.4 se observa que el mejor ajuste a esta cinética se da a la temperatura de -10 °C. A -20 °C el ajuste disminuye y a -30 °C tiene unos valores de R^2 muy bajos. La tabla 4.5.5 muestra el análisis de regresión no lineal utilizando el parámetro A_{21} y la metodología descrita en material y métodos. La figura 4.5.9 muestra los valores predichos y observados que indicaron un buen ajuste del modelo sobre todo a -10 °C.

Tabla 4.5.4: Parámetros de la regresión de orden cero (\pm error estándar) ($A_0-A=kt$) de la amplitud A_{21} de filetes de merluza almacenados a -10, -20, -30 °C

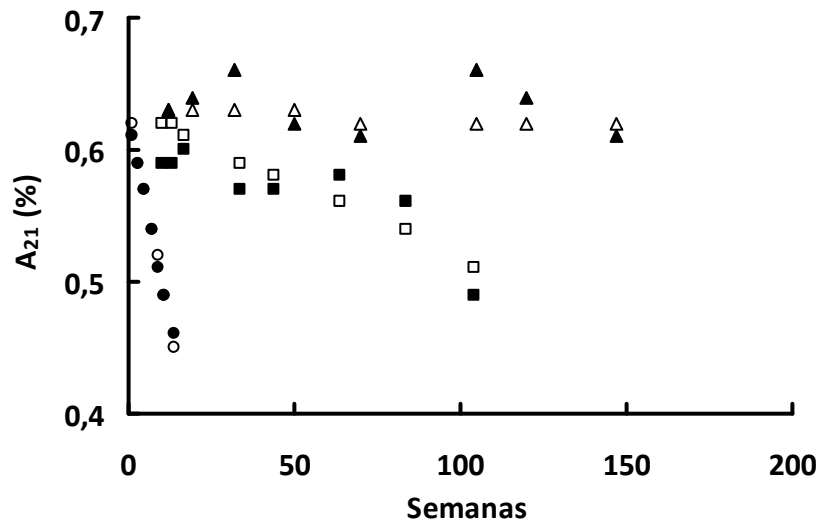
		TEMPERATURA °C		
Modelo cinético		-10 (N = 11)	-20 (N = 8)	-30 (N = 8)
Orden cero	A_0	0,624 \pm 0,003	0,607 \pm 0,012	0,639 \pm 0,013
	k	-0,012 \pm 0,000	-0,001 \pm 0,000	-0,000 \pm 0,000
	R^2	0,99	0,71	0,04

A es la variable respuesta (%), A_0 es el valor inicial, k es la constante de velocidad medida en semanas^{-1} y t es el tiempo de conservación medido en semanas. Los datos están calculados con la media de los valores hallados por tiempo y temperatura de conservación

Tabla 4.5.5: Parámetros de la regresión (\pm error estándar) de los datos medios de la amplitud A_{21} (%) de filetes de merluza almacenados a -10, -20 y -30 °C

Modelo	Parámetros	Estimación
Orden cero	A_0	0,630 \pm 0,006
	k_{ref}	0,001 \pm 0,000
	B	16095 \pm 871
	R^2	0,89

Los parámetros fueron extraídos de la ecuación: $A = A_0 + k_{ref} t \exp [-B(1/T-1/T_{ref})]$. $T_{ref} = 253$ °K, k_{ref} corresponde a la constante de velocidad a la temperatura T_{ref} , B es una constante y T es la temperatura absoluta medida en °K



Figuras 4.5.9: Valores predichos por el modelo cinético (símbolos vacíos) y valores medios observados (símbolos llenos) de la amplitud A_{21} mediante el análisis biexponencial en función del tiempo de conservación (semanas) de filetes de merluza conservados a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (círculo), $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (cuadrado) y $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (triángulo)

Además de analizar los parámetros por separado, se utilizó el componente principal obtenido de los parámetros extraídos por análisis biexponencial. La cinética del PC se ajustó a una ecuación de orden cero (tabla 4.5.6), se obtuvieron los valores A_0 , k_{ref} y B (tabla 4.5.7) en el rango de -10 a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la figura 4.5.10 muestra los valores predichos y observados para este modelo donde existe un buen ajuste, aunque los errores estándar se consideraron más altos que cuando se utiliza A_{21} por separado.

Tabla 4.5.6: Parámetros de la regresión de orden cero (\pm error estándar) ($A_0-A=kt$) del PC realizado mediante los análisis biexponenciales en filetes de merluza almacenados a -10, -20 y -30 °C

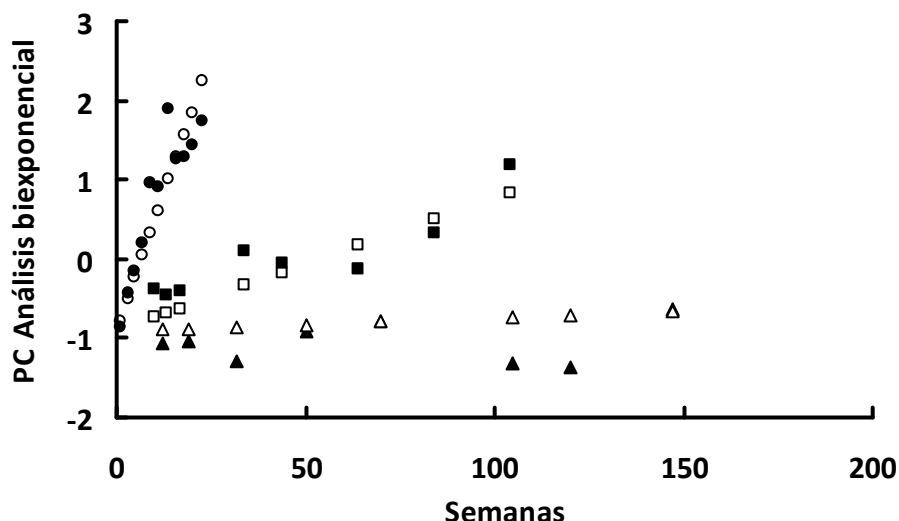
		TEMPERATURA °C		
Modelo cinético		-10 (N=11)	-20 (N=8)	-30 (N=8)
Orden cero	A_0	-0,582±0,238	-0,625±0,160	-1,105±0,175
	k	0,115±0,018	0,014±0,003	0,001±0,002
	R^2	0,83	0,81	0,22

Donde A es la variable respuesta del PC, A_0 es el valor inicial, k es la constante de velocidad medida en semanas⁻¹ y t es el tiempo de conservación medido en semanas. Los datos están calculados con la media de los valores hallados por tiempo y temperatura de conservación

Tabla 4.5.7: Parámetros de la regresión (\pm error estándar) del PC obtenido a partir de los datos medios biexponenciales en filetes de merluza almacenados a -10, -20, -30 °C

Modelo	Parámetros	Estimación
Orden cero	A_0	-0,912±0,115
	k_{ref}	0,017±0,003
	B	13970±1083
	R^2	0,87

Los parámetros fueron extraídos de la ecuación: $A = A_0 + k_{ref} t \exp [-B(1/T-1/T_{ref})]$. $T_{ref} = 253$ °K, k_{ref} corresponde a la constante de velocidad a la temperatura T_{ref} , B es una constante y T es la temperatura absoluta medida en °K



Figuras 4.5.10: Valores predichos por el modelo cinético (símbolos vacíos) y valores medios observados (símbolos llenos) del análisis biexponencial en función del tiempo de conservación (semanas) de filetes de merluza conservados a -10 °C (círculo), -20 °C (cuadrado), -30 °C (triángulo)

En cuarto lugar, se realizó una modelización con el PC1 obtenido a través de los datos medios por semana del análisis CONTIN utilizando también en este caso una cinética de orden 0. Como se indicó previamente, la figura 4.5.8 mostró para este PC unas claras diferencias en la relación tiempo temperatura por lo que se consideró buen candidato para la modelización cinética. Sin embargo este PC cubre un amplio rango del espectro y según se ha observado en las figuras 4.5.3 y 4.5.4, los cambios en las bandas correspondientes a T_{21} y T_{22} podían en principio guardar una relación diferente con la temperatura de conservación. Así, es posible que dentro del espectro CONTIN (10-1000 ms) existieran cinéticas diferentes dependiendo de la zona seleccionada. Por ello en este caso se consideró realizar la modelización dividiendo la señal en diferentes rangos (figura 4.5.11). Éstos fueron de 12 a 112 ms, de 112 a 400 ms, y de 112 a 700 ms correspondientes a la banda con protones de movilidad intermedia (T_{21}) el primero y alta (T_{22}) los dos siguientes. Así mismo se analizaron rangos que incluyeron ambas bandas (12-400 y 12-700 ms).

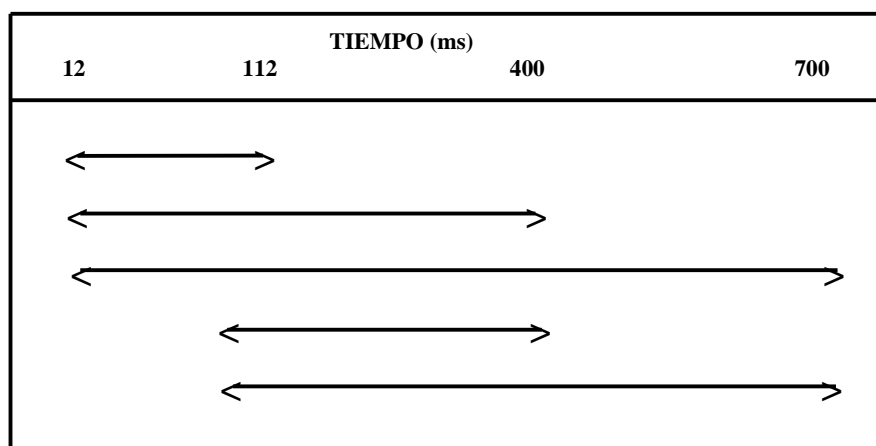


Figura 4.5.11: Esquema de los rangos elegidos utilizando el análisis CONTIN para realizar la modelización cinética. Cada franja, delimita el rango seleccionado medido en ms

La tabla 4.5.8 muestra que en todos los casos el primer componente explicó entre el 61 y el 85 % de la varianza. Tras observar que el PC1 en todos ellos guardaba una dependencia con la temperatura y el tiempo (resultados no mostrados), se utilizaron estos PC1 para seleccionar el orden de la reacción correspondiente. En todos los casos los mejores R^2 se obtuvieron cuando las cinéticas se adecuaban a un orden cero y éstas se muestran en la tabla 4.5.9. La relación de la velocidad de reacción (k) con el inverso de la temperatura absoluta en cada rango estudiado se observa en la figura 4.5.12. En todos hubo una tendencia lineal entre -10, -20 y -30 °C.

Tabla 4.5.8: Varianza explicada acumulada en % de los PC del análisis CONTIN mediante relaxometría ^1H RMN de bajo campo en todos los rangos de tiempo seleccionados

Componentes	Varianza explicada acumulada (%)				
	12-112 ms	112-400 ms	112-700 ms	12-400 ms	12-700 ms
1	61	85	77	62	61
2	86	96	90	80	77
3	94	99	97	92	88
4	98	100	99	95	93
5	99	-	100	98	96
6	100	-	-	99	98
7	-	-	-	100	99
8	-	-	-	-	100

Tabla 4.5.9: Parámetros de la regresión de orden cero (\pm error estándar) ($A_0-A=kt$) del PC1 realizado mediante el análisis CONTIN de filetes de merluza almacenados a -10, -20 y -30 °C

		TEMPERATURA °C		
Modelo cinético		-10 (N = 11)	-20 (N = 8)	-30 (N = 8)
Rango (ms)	Parámetros			
12-112	A_0	-0,350±0,281	-0,790±0,209	-0,796±0,120
	k	0,101±0,021	0,014±0,004	-0,003±0,001
	R^2	0,72	0,72	0,43
112-400	A_0	-0,768±0,345	-0,577±0,283	-1,166±0,170
	k	0,125±0,026	0,012±0,005	0,004±0,002
	R^2	0,73	0,49	0,37
112-700	A_0	-0,904±0,352	-0,613±0,206	-1,012±0,122
	k	0,135±0,026	0,013±0,004	0,002±0,001
	R^2	0,75	0,68	0,22
12-400	A_0	-0,637±0,154	-0,737±0,063	-1,063±0,118
	k	0,124±0,011	0,014±0,001	0,001±0,001
	R^2	0,93	0,96	0,04
12-700	A_0	-0,729±0,200	-0,732±0,056	-0,989±0,101
	k	0,130±0,015	0,014±0,01	0,000±0,001
	R^2	0,89	0,97	0,001

A es la variable respuesta del PC, A_0 es el valor inicial, k es la constante de velocidad medida en semanas⁻¹ y t es el tiempo de conservación medido en semanas. Los datos están calculados con la media de los valores hallados por tiempo y temperatura de conservación

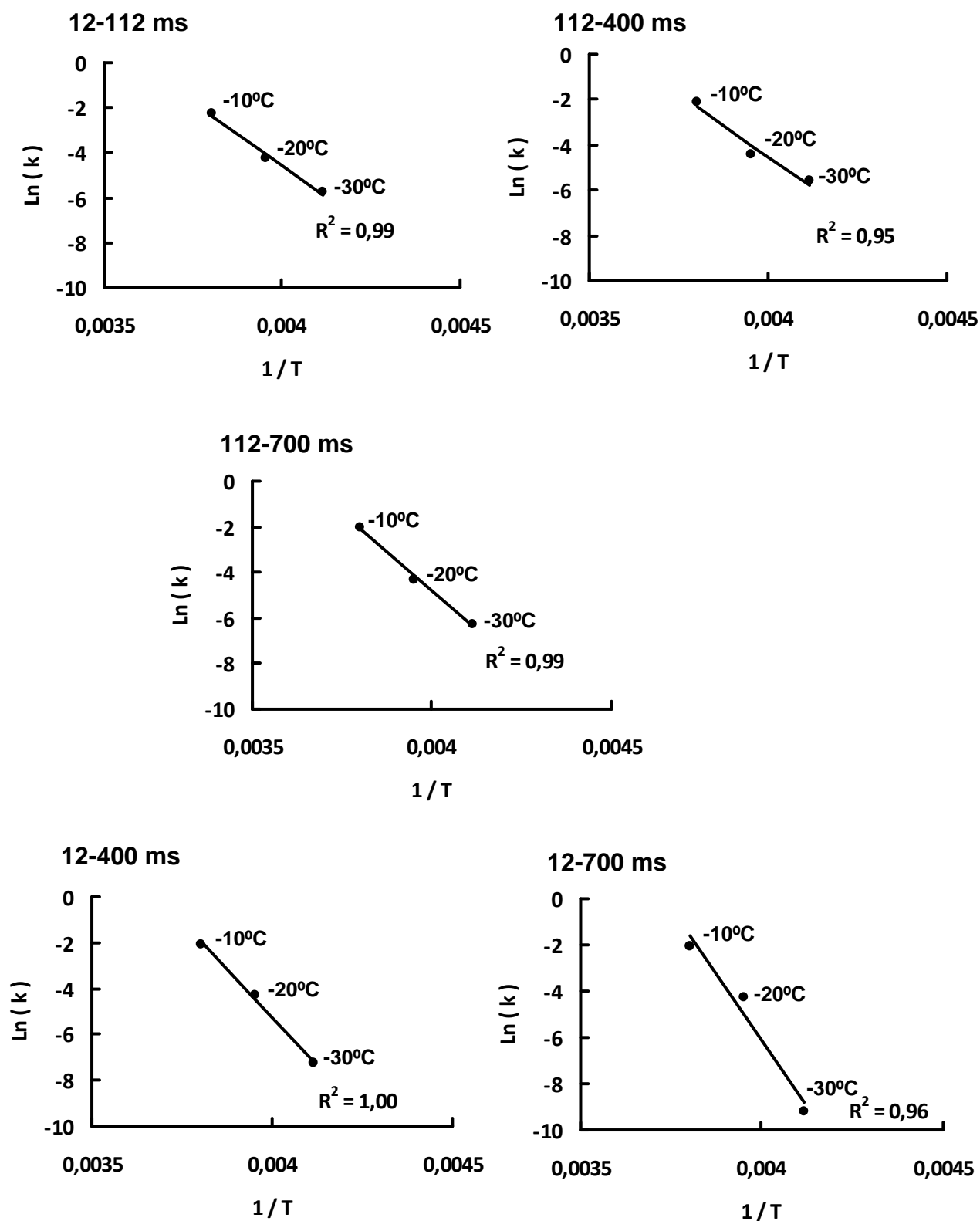


Figura 4.5.12: Dependencia del \ln de la constante de velocidad k con la inversa de la temperatura en todos los rangos estudiados en el análisis CONTIN

Por lo tanto, al igual que en casos anteriores, se efectuó un análisis de regresión no lineal (tabla 4.5.10) y se observó que los mejores modelos se obtuvieron cuando se usan los rangos en los que están incluidos protones de movilidad intermedia y alta (12-400 y 12-700 ms) con errores más bajos y mayores R^2 . Aunque las diferencias entre ambos casos fueron escasas, el mejor modelo se obtuvo entre los 12 y los 400 ms.

Una vez realizada una selección del rango con los valores medios por semana de congelación, el modelo cinético final se efectuó con todos los datos (tabla 4.5.11, figura 4.5.13). Como era de esperar, se obtuvieron menores valores de error estándar pero una disminución en el coeficiente de determinación. Este efecto está vinculado al tamaño muestral y refleja el hecho de que en el cálculo de los errores estándar, éstos están inversamente relacionados con la raíz cuadrada de este tamaño muestral. Asimismo, el cálculo del coeficiente de determinación depende de la covarianza que está inversamente relacionada con el tamaño de la muestra (Ríus-Díaz & Wärnberg, 2014). Se observa que el modelo tiene un buen ajuste entre los valores reales y los predichos a -10 y a 20 °C aunque éste es peor a -30 °C. El análisis de los residuos, indicó que éstos estaban distribuidos al azar y de forma no correlacionada.

Tabla 4.5.10: Parámetros de la regresión (\pm error estándar) de los PC obtenidos mediante los datos medios del análisis CONTIN en filetes de merluza almacenados a -10, -20 y -30 °C

Modelo cinético		
Rango (ms)	Parámetros	Estimación
12-112	A_0	-0,843\pm0,129
	k_{ref}	0,014\pm0,003
	B	15133\pm1516
	R²	0,83
112-400	A_0	-0,870\pm0,142
	k_{ref}	0,016\pm0,004
	B	14062\pm1418
	R²	0,80
112-700	A_0	-0,895\pm0,129
	k_{ref}	0,017\pm0,003
	B	13928\pm1241
	R²	0,83
12-400	A_0	-0,919\pm0,076
	k_{ref}	0,016\pm0,002
	B	14671\pm770
	R²	0,94
12-700	A_0	-0,923\pm0,080
	k_{ref}	0,016\pm0,002
	B	14508\pm796
	R²	0,93

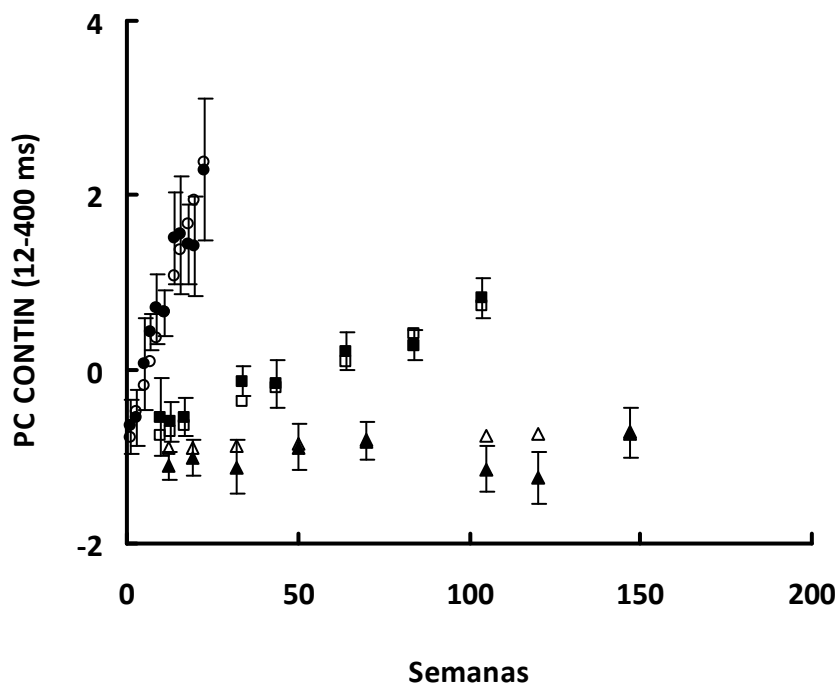
Los parámetros fueron extraídos de la ecuación: $A = A_0 + k_{ref} t \exp [-B(1/T - 1/T_{ref})]$. $T_{ref} = 253$ °K, k_{ref} corresponde a la constante de velocidad a la temperatura T_{ref} , B es una constante y T es la temperatura absoluta medida en °K

Tabla 4.5.11: Parámetros de la regresión (\pm error estándar) del PC obtenido mediante todos los datos del análisis CONTIN (N=135 individuos) en el rango entre 12 a 400 ms de filetes de merluza almacenados a -10, -20 y -30 °C

Modelo cinético		
Rango	Parámetros	Estimación
12-400	A_0	-0,869\pm0,027
	k_{ref}	0,015\pm0,001
	B	14690\pm293
	R²	0,81

Los parámetros fueron extraídos de la ecuación: $A = A_0 + k_{ref} t \exp [-B(1/T-1/T_{ref})]$. $T_{ref} = 253$ °K, k_{ref} corresponde a la constante de velocidad a la temperatura T_{ref} , B es una constante y T es la temperatura absoluta medida en °K

A la luz de todos los resultados se considera que el análisis más adecuado para realizar la modelización cinética en relaxometría ^1H RMN de bajo campo es el que utiliza el PC del análisis CONTIN en el rango entre los 12 y los 400 ms. Además de obtener el mejor ajuste, la señal incluye los tiempos de relajación de los protones que más cambios presentan a consecuencia de la conservación en congelación (T_{21} y T_{22}). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en las energías de activación en los rangos estudiados representadas por el parámetro B (tabla 4.5.10) lo que parece indicar una dependencia similar con la temperatura.



Figuras 4.5.13: Valores predichos por el modelo cinético (símbolos vacíos) y todos los valores observados (símbolos llenos \pm desviación estándar) del análisis CONTIN en el rango entre los 12 y los 400 ms en función del tiempo de conservación (semanas) de filetes de merluza conservados a -10 °C (circulo), -20 °C (cuadrado) y -30 °C (triángulo)

Las funciones que integran tiempo y temperatura con el fin de medir la calidad de los procesos que ocurren durante la conservación de músculo de pescado, por lo general siguen un patrón similar (Bremner et al. 1987). En esta Tesis se ha observado que los valores del parámetro B de resistencia a la cizalladura (sección 4.3) y del análisis de relaxometría fueron similares. En la misma línea Careche et al. (2015) obtuvieron en los modelos cinéticos por espectroscopía FTIR para el estudio de la fracción lipídica del músculo de merluza conservada en estado congelado unos valores del parámetro B (14257 ± 760 ; 12032 ± 549 y 13584 ± 350) que también eran similares a los datos presentados en este capítulo.

Los resultados de este experimento (figura 4.5.13) sugieren que las estimaciones de tiempo se pueden realizar a temperaturas de conservación de -10 y -20 °C, aunque a -30 °C existe una mayor falta de ajuste entre los datos observados y los datos predichos. Esto puede deberse en parte al error experimental de los datos a -30 °C. Otro de los aspectos a considerar es que en general, en músculo de pescado, todos los procesos degradativos que ocurren durante la conservación en frío pueden tener un “cero biológico” en el cual las reacciones cesan (Bremner et al. 1987). Es por tanto probable que en este caso este cero biológico esté a temperaturas inferiores pero cercanas a -30 °C.

La existencia de un cero biológico implica que no existe una linealidad de las energías de activación en función de la temperatura, y ésta puede darse únicamente en un rango determinado. Así cuando se incluían los resultados obtenidos a -80 °C se observó que el modelo de Arrhenius empeoraba (resultados no mostrados). En la literatura se han propuesto modelos alternativos cuando se observa que a ciertos rangos de temperatura el sistema que se está estudiando puede ser prácticamente inerte y sólo cuando existe un aumento de temperatura es cuando la actividad del sistema se acelera (p.e. Peleg 2002). No se consideró su uso ya que habitualmente se requiere un número de temperaturas de análisis superior al utilizado en este trabajo y por otro lado el rango de interés en conservación de pescado está entre -10 °C y -30 °C por lo que es mejor acotar éste a la hora de modelizar los parámetros que pueden utilizarse para estimar la calidad.

Otro aspecto a considerar es el hecho de que los datos iniciales a -80 °C están por debajo del resto de temperaturas de conservación utilizadas (figura 4.5.8). La tabla 4.5.10 muestra cómo el parámetro A_0 en el rango del mejor modelo (12-400 ms)

disminuye a medida que la temperatura de conservación es más baja. Esta ausencia de ajuste puede estar reflejando la importancia de las diferencias en formación y crecimiento de los cristales de hielo en función de la temperatura final de congelación. En la misma línea, Sánchez-Alonso et al. (2014), observaron valores de amplitud de A_{21} inferiores a medida que disminuyó la velocidad de congelación que asociaron a las conocidas diferencias en tamaño de los cristales de hielo en función de la velocidad y temperatura final de congelación (Becker & Fricke 2003). Es posible por lo tanto que haya un cierto efecto de las condiciones iniciales que debiera ser objeto de estudio en trabajos posteriores.

Una de las principales ventajas que ofrece la relaxometría ^1H RMN de bajo campo como indicador de la calidad del músculo de pescado congelado, es la obtención de información relevante tanto a nivel ultraestructural (heterogeneidad en los espacios musculares por la presencia de cristales de hielo) como a nivel molecular (por ejemplo desnaturalización y agregación de proteínas). Esta información es compatible con los resultados obtenidos mediante otras técnicas físico-químicas rutinarias para medir la calidad, que ya se sabe que correlacionan bien con los parámetros espectroscópicos como se vio en la sección 4.2. Sin embargo, el uso de estos modelos debe ser validado con nuevos lotes de pescado. De este modo cuando este método esté estandarizado se podría plantear la posibilidad de sustituir los métodos físico-químicos por la técnica de la relaxometría ^1H RMN de bajo campo, teniendo la ventaja de que la relaxometría es una técnica más rápida.

Los análisis de relaxometría ^1H realizados en este apartado indican que existe una dependencia clara de los parámetros de relaxometría con la temperatura y con el

tiempo de conservación de tal forma que a medida que las temperaturas de conservación son mayores y los tiempos más prolongados existen cambios más pronunciados en estos parámetros. Como ya se había observado en el apartado 4.2, las modificaciones son debidas a cambios que ocurren en el agua muscular (intercambios químicos de sus protones y cambios difusivos) que a su vez se relacionan con alteraciones en las proteínas miofibrilares y a nivel ultraestructural como consecuencia de la conservación en congelación.

La dependencia de los parámetros de relaxometría con la temperatura y con el tiempo de conservación observados en este trabajo sugiere que es posible utilizar éstos para realizar modelos cinéticos en el rango -10 a -30 °C. De esta forma sería posible estimar la calidad de los productos pesqueros a temperaturas de conservación donde el riesgo de que el producto pueda sufrir un deterioro es más acentuado. Además, el hecho de que estos modelos posean energías de activación semejantes a otros realizados con parámetros físico-químicos (p.e. resistencia a la cizalladura) y espectroscópicos (p.e. FTIR de la fracción lipídica) pueden reforzar este método como herramienta complementaria para estudios de calidad y/o estimación de la vida útil de la merluza conservada en congelación.

El contenido de este capítulo ha sido publicado en la revista Food and Bioprocess Technology: **Sánchez-Valencia, J., Sánchez-Alonso, I., Martínez, I., & Careche, M.** (2015). Low-Field Nuclear Magnetic Resonance of Proton (^1H LF NMR) Relaxometry for Monitoring the Time and Temperature History of Frozen Hake (*Merluccius merluccius* L.) Muscle. *Food and Bioprocess Technology*, 8(10), 2137-214. **Ver anexo: punto 3**

Estos resultados han sido presentados en forma de poster en el congreso internacional TAFT 2012: **Careche, M., Sánchez-Valencia, J., Sánchez-Alonso, I. & Martínez, I.** Modeling Time and Temperature History of Frozen Thawed Hake (*Merluccius merluccius* L.) muscle by Low Field Nuclear magnetic Resonance spectroscopy (LF NMR). **Ver anexo: punto 6**

5.- CONCLUSIONES

1. Se han observado cambios en los parámetros de relaxometría ^1H RMN de bajo campo a lo largo de la conservación de músculo merluza (*Merluccius merluccius* L.) en estado congelado que se consideran provocados por los movimientos rotacionales y difusivos del agua muscular así como por intercambios químicos entre sus protones y los protones de otros biopolímeros, fundamentalmente proteínas del músculo.
2. Estas modificaciones pueden tener su origen en las alteraciones que sufre el músculo a consecuencia de la congelación y conservación en el estado congelado ya que se han observado junto con marcadores físico-químicos utilizados habitualmente en el estudio del deterioro que sufre el músculo de esta especie.
3. La dependencia con la temperatura y el tiempo de conservación tanto de los parámetros de relaxometría como de los físico-químicos ha permitido obtener modelos cinéticos a temperaturas en el rango de las utilizadas a nivel comercial.
4. Los buenos ajustes entre valores observados y predichos sugieren la utilidad de estos modelos como herramientas para evaluar y/o estimar la calidad en merluza (*Merluccius merluccius* L.) congelada en relación con su historia térmica en rangos donde el deterioro es más acentuado, pero requieren ser validados con nuevos lotes de pescado.
5. El hecho de que los modelos obtenidos por ^1H RMN de bajo campo posean energías de activación semejantes a los de los métodos físico-químicos utilizados en esta Tesis, puede reforzar la relaxometría como un método alternativo o complementario a los que se utilizan habitualmente en esta especie.

6.- BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M. R., & Moss, M. O. (1997). Microbiología de los alimentos principales In T. Graham (Ed.), *Microbiología de los alimentos*, (pp. 149-156) Zaragoza (España): Acribia.
- AOAC. (1995). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemist*. Gaithersburg, Maryland, USA: AOAC International.
- Aubourg, S. P. (1999). Efecto de las alteraciones lipídicas sobre la calidad del pescado procesado. *Grasas y Aceites*, 50, 218-224.
- Aubourg, S. P., Lago, H., Sayar, N., & González, R. (2007). Lipid damage during frozen storage of Gadiform species captured in different seasons. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(6), 608-616.
- Aubourg, S. P., & Medina, I. (1999). Influence of storage time and temperature on lipid deterioration during cod (*Gadus morhua*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) frozen storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(13), 1943-1948.
- Aubourg, S. P., Rey-Mansilla, M., & Sotelo, C. G. (1999). Differential lipid damage in various muscle zones of frozen hake (*Merluccius merluccius*). *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung a-Food Research and Technology*, 208(3), 189–193.
- Aursand, I. G. (2009). *Low-field NMR and MRI studies of fish muscle. Effects of raw material quality and processing*. PhD Thesis. Norwegian University of Science and Technology. Norway.
- Aursand, I. G., Gallart-Jornet, L., Erikson, U., Axelson, D. E., & Rustad, T. (2008). Water Distribution in Brine Salted Cod (*Gadus morhua*) and Salmon (*Salmo salar*): A Low-Field ^1H NMR Study. *J Agric Food Chem*, 56(15), 6252-6260.
- Aursand, I. G., Veliyulin, E., Böcker, U., Ofstad, R., Rustad, T., & Erikson, U. (2009). Water and Salt Distribution in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Studied by Low-Field ^1H NMR, ^1H and ^{23}Na MRI and Light Microscopy: Effects of Raw Material Quality and Brine Salting. *J Agric Food Chem*, 57(1), 46-54.
- Aursand, I. G., Veliyulin, E., & Erikson, U. (2006). Low Field NMR Studies of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Modern Magnetic Resonance. In G. A. Webb (Ed.), (pp. 905-913): Springer Netherlands.
- Bain, A. D. (2003). Chemical exchange in NMR. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 43(3), 63-103.

- Bakmutov, V. I. (2004). How and why nuclei relax. In V.I. Bakmutov (Ed.), *Practical NMR relaxation for chemists*. (pp. 4-18). San Francisco (USA): John Wiley & sons, Ltd.
- Barroso, M., Careche, M., & Borderías, A. J. (1998a). Quality control of frozen fish using rheological techniques. *Trends in Food Science & Technology*, 9(6), 223-229.
- Barroso, M., Careche, M., Barrios, L., & Borderias, A. J. (1998b). Frozen Hake Fillets Quality as Related to Texture and Viscosity By Mechanical Methods. *J Food Sci*, 63(5), 793-796.
- Becker, B. R., & Fricke, B. A. (2003). Freezing principles. In C. Benjamin (Ed.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (2nd Ed., pp. 2706–2711). Oxford: Academic Press.
- Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). Peces, cetáceos, crustáceos y moluscos. In H. D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle (Eds.), *Química de los Alimentos*, (pp. 533-572). Zaragoza (España): Acribia.
- Bello, J. (2010). Carnes y derivados. In A. Gil (Ed.), *Tratado de Nutrición. composición y calidad nutritiva de los alimentos*, vol. II (pp. 25-54). Madrid, (España): Médica Panamericana.
- Belton, P. (2011). Spectroscopic Approaches to the Understanding of Water in Foods. *Food Reviews International*, 27(2), 170-191.
- Belton, P. S. (1997). NMR and the mobility of water in polysaccharide gels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 21(1–2), 81-88.
- Belton, P. S. (2000). Nuclear magnetic resonance studies of the hydration of proteins and DNA. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 57(7), 993-998.
- Belton, P. S., Hills, B. P., & Raimbaud, E. R. (1988). The effects of morphology and exchange on proton N.M.R. relaxation in agarose gels. *Molecular Physics*, 63(5), 825–842.
- Belton, P. S., Jackson, R. R., & Packer, K. J. (1972). Pulsed NMR studies of water in striated muscle. I. Transverse nuclear spin relaxation times and freezing effects. *Biochim Biophys Acta*, 286(1), 16-25.
- Bertram, H. C., & Andersen, H. J. (2004). Applications of NMR in Meat Science. In G. A. Webb (Ed.), *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, Volume 53 (pp. 157-202): Academic Press.
- Bertram, H. C., & Andersen, H. J. (2007). NMR and the water-holding issue of pork.

- Journal of Animal Breeding and Genetics*, 124, 35-42.
- Bertram, H. C., & Andersen, H. J. (2008). Proton NMR Relaxometry in Meat Science. In G. A. Webb (Ed.) *Modern Magnetic Resonance*, (pp. 1729-1733). Netherlands: Springer
- Bertram, H. C., Andersen, R. H., & Andersen, H. J. (2007). Development in myofibrillar water distribution of two pork qualities during 10-month freezer storage. *Meat Science*, 75(1), 128-133.
- Bertram, H. C., Dønstrup, S., Karlsson, A. H., & Andersen, H. J. (2002b). Continuous distribution analysis of T₂ relaxation in meat - An approach in the determination of water-holding capacity. *Meat Science*, 60(3), 279-285.
- Bertram, H. C., Engelsens, S. B., Busk, H., Karlsson, A. H., & Andersen, H. J. (2004b). Water properties during cooking of pork studied by low-field NMR relaxation: effects of curing and the RN--gene. *Meat Science*, 66(2), 437-446.
- Bertram, H. C., Karlsson, A. H., Rasmussen, M., Pedersen, O. D., Dønstrup, S., & Andersen, H. J. (2001). Origin of Multiexponential T₂ Relaxation in Muscle Myowater. *J Agric Food Chem*, 49(6), 3092-3100.
- Bertram, H. C., Purslow, P. P., & Andersen, H. J. (2002a). Relationship between Meat Structure, Water Mobility, and Distribution: A Low-Field Nuclear Magnetic Resonance Study. *J Agric Food Chem*, 50(4), 824-829.
- Bertram, H. C., Schäfer, A., Rosenvold, K., & Andersen, H. J. (2004a). Physical changes of significance for early *post mortem* water distribution in porcine M. longissimus. *Meat Science*, 66(4), 915-924.
- Bligh, E. G., Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemical and Physiology*, 37(8), 911-917.
- Bloch, F., Hansen, W. W., & Packard, M. (1946). Nuclear Induction. *Physical Review*, 69(3-4), 127-127.
- Borderías A.J., Jiménez Colmenero F., Tejada M. (1985). Parameters affecting viscosity as a quiality control for frozen fish. *Marine fish Rev.* 47 43-45.
- Borderias, A. J., Lamua, M., & Tejada, M. (1983). Texture analysis of fish fillets and minced fish by both sensory and instrumental methods. *International Journal of Food Science & Technology*, 18(1), 85-95.
- Bourne, M. (2002). Food texture and viscosity. Concept and Measurement (Second Edition). In M. Bourne (Ed.), . Food Science and Technology. (pp. 415-423). New York (USA): Academic Press. Disponible en

- <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780121190620>
- Bremner, H. A. (2000). Toward Practical Definitions of Quality for Food Science. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 40(1), 83-90.
- Bremner, H. A. (2004). Quality issues and more efficient utilization of the fish catch. *Developments in Food Science*, 42, 275-287.
- Bremner, H. A., Olley, J., & Vail, A. M. A. (1987). Estimating timetemperature effects by a rapid systematic sensory method. In D. E. Kramer & J. Liston (Eds.), *Seafood quality determination, Proceedings of an International Symposium Coordinated by the University Of Alaska Sea Grant College Program, Anchorage, Alaska, U.S.A. 10–14 November 1986* (pp. 413–435). Amsterdam:Elsevier Science Publishers B.V.
- Bremner, H. A., & Sakaguchi, M. (2000). A Critical Look at Whether ‘Freshness’ Can Be Determined. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 9(3), 5-25.
- Brown, R. J. S., Capozzi, F., Cavani, C., Cremonini, M. A., Petracci, M., & Placucci, G. (2000). Relationships between H-1 NMR relaxation data and some technological parameters of meat: A chemometric approach. *Journal of Magnetic Resonance*, 147(1), 89-94.
- Bruker, G. O. (2005). Bruker The minispec NMR Principles. In *Basic physical principles of NMR*. Germany:Bruker Optik GmbH.
- Burgaard, M. G., & Jørgensen, B. M. (2010). Effect of temperature on quality-related changes in cod (*Gadus morhua*) during short- and long-term frozen storage. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 19(3-4), 249-263.
- Careche, M., & Barroso, M. (2009). Texture in seafood. In H. Rebbelin & J. Ochenschlager (Eds.), *Fishery Products: Quality Safety and Authenticity*, (pp. 214-231). Oxford, UK: Willey Blackwell.
- Careche, M., Carmona, P., & Sánchez-Alonso, I. (2015). Monitoring the Time and Temperature History of Frozen Hake (*Merluccius merluccius*, L.) Muscle by FTIR Spectroscopy of the Lipid Fraction. *Food and Bioprocess Technology*, 8(1), 112-119.
- Careche, M., del Mazo, M. L., & Fernández-Martín, F. (2002a). Extractability and thermal stability of frozen hake (*Merluccius merluccius*) fillets stored at –10 and –30 °C. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(15), 1791-1799.
- Careche, M., Del Mazo, M. L., Torrejón, P., & Tejada, M. (1998). Importance of Frozen Storage Temperature in the Type of Aggregation of Myofibrillar Proteins in Cod

- (*Gadus morhua*) Fillets. *J Agric Food Chem*, 46(4), 1539-1546.
- Careche, M., García, M. L., Herrero, A., Solas, M. T., & Carmona, P. (2002b). Structural Properties of Aggregates from Frozen Stored Hake Muscle Proteins. *J Food Sci*, 67(8), 2827-2832.
- Careche, M., Herrero, A. M., Rodriguez-Casado, A., Del Mazo, M. L., & Carmona, P. (1999). Structural changes of hake (*Merluccius merluccius* L.) fillets: Effects of freezing and frozen storage. *J Agric Food Chem*, 47(3), 952-959.
- Careche, M., & Li-Chan, E.C.Y. (1997) Structural changes in cod myosin after modification with formaldehyde or frozen storage. *J Food Sci*, (62), 717-723.
- Careche, M., & Tejada, M. (1990). The effect of neutral and oxidized lipids on functionality in hake (*Merluccius merluccius* L.): A dimethylamine- and formaldehyde-forming species during frozen storage. *Food Chemistry*, 36(2), 113-128.
- Carmona, P., Sánchez-Alonso, I., & Careche, M. (2010). Chemical changes during freezing and frozen storage of fish investigated by vibrational spectroscopy. In C. Y. Eunice, Li-Chan, P. R. Griffiths & J. M. Chalmers (Eds.), *Applications of vibrational spectroscopy in food science*, (pp. 229-241). United Kingdom: John Wiley & sons, Ltd.
- Carneiro, C. d. S., Mársico, E. T., Ribeiro, R. d. O. R., Conte Júnior, C. A., Álvares, T. S., & Jesus, E. F. O. d. (2013). Studies of the effect of sodium tripolyphosphate on frozen shrimp by physicochemical analytical methods and Low Field Nuclear Magnetic Resonance (LF ^1H NMR). *LWT - Food Science and Technology*, 50(2), 401-407.
- Cheng, J-H., Dai, Q., Sun, D-W., Zeng, X-A., Liu, D., & Pu, H-B. (2013). Applications of non-destructive spectroscopic techniques for fish quality and safety evaluation and inspection. *Trends in Food Science and Technology*, 34, 18-31.
- Del Mazo, M. L., Torrejón, P., Careche, M., & Tejada, M. (1999). Characteristics of the Salt-Soluble Fraction of Hake (*Merluccius merluccius*) Fillets Stored at -20 and -30 °C. *J Agric Food Chem*, 47(4), 1372-1377.
- Erikson, U., Standal, I. B., Aursand, I. G., Veliyulin, E., & Aursand, M. (2012). Use of NMR in fish processing optimization: a review of recent progress. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 50(7), 471-480.

- Erikson, U., Veliyulin, E., Singstad, T. E., & Aursand, M. (2004). Salting and desalting of fresh and frozen-thawed cod (*Gadus morhua*) fillets: A comparative study using ^{23}Na NMR, ^{23}Na MRI, low-field ^1H NMR, and physicochemical analytical methods. *J Food Sci*, 69(3), 107-114.
- FAO. (1998). *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. In H.H. Huss (Ed.), *El Pescado Fresco: Su Calidad y Cambios de su Calidad*. Dinamarca:Ministerio de pesca. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/v7180s/v7180s00.htm#Contents>
- FAO. (2012). Food and Agriculture Organization of the United Nations. In *El estado mundial de la pesca y la acuicultura*. Roma: Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/016/i2727s/i2727s.pdf>.
- Fennema, O. R. (1996). Water and Ice. In O. R. Fennema (Ed.), *Food Chemistry*, (pp. 17-94). New York, USA: Marcel Dekker, Inc.
- Fu, B., Labuza, P., (1997). Shelf life of frozen foods. In T.P., Labuza & B. Fu. *Shelf Life Testing, Procedures and Prediction Methods*. (pp.377–415) (Chapter 19). Denver: CRC Press.
- Fu, B., & Labuza, P. (1993). Shelf-life prediction: theory and application. *Food Control*, 4(3), 125-133.
- García, M. L., Martín-Benito, J., Solas, M. T., & Fernández, B. (1999). Ultrastructure of the Myofibrillar Component in Cod (*Gadus morhua* L.) and Hake (*Merluccius merluccius* L.) Stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ as a Function of Time. *J Agric Food Chem*, 47(9), 3809-3815.
- Gonçalves, E. M., Pinheiro, J., Abreu, M., Brandão, T. R. S., Silva, C. L. M. (2011). Kinetics of quality changes of pumpkin (*Curcubita maxima* L.) stored under isothermal and non-isothermal frozen conditions. *Journal of Food Engineering*, 106(1), 40-47.
- Gudjónsdóttir, M., Arason, S., & Rustad, T. (2011). The effects of pre-salting methods on water distribution and protein denaturation of dry salted and rehydrated cod - A low-field NMR study. *Journal of Food Engineering*, 104(1), 23-29.
- Hamm, R. (1986). Functional properties of the myofibrillar system and their measurements. In Bechtel P. J. *Muscle as Food*, (p.p. 135-192). Florida, USA: Academic press, INC
- Heia, K., Esaiassen, M., Nilsen, H., & Sigernes, F. (2003). Visible spectroscopy evaluation of storage time of ice stored cod and frozen hake. In J. B. Luten, J.

- Oehlenschläger, & G. Ólafsdóttir (Eds.), *Quality of fish from catch to consumer: labelling, monitoring and traceability* (pp. 201–209). The Netherlands: Wageningen Academic Publishers.
- Herrera, C. H., Bolaños, N., & Lutz, G. (2003). Pescados y Mariscos. In C. H. Herrera (Ed.), *Química de Alimentos. Manual de laboratorio*, (pp. 79-89). San José (Costa Rica): Universidad de Costa Rica Ciudad Universitaria "Rodrigo Facio".
- Herrero, A. M., & Careche, M. (2005). Stress-relaxation test to evaluate textural quality of frozen stored Cape hake (*M. capensis* and *M. paradoxus*). *Food Research International*, 38(1), 69-76.
- Herrero, A. M., & Careche, M. (2006). Prediction of frozen storage time of Cape hake (*Merluccius capensis* and *Merluccius paradoxus*) by instrumental methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13), 2128-2133.
- Herrero, A. M., Carmona, P., & Careche, M. (2004). Raman Spectroscopic Study of Structural Changes in Hake (*Merluccius merluccius* L.) Muscle Proteins during Frozen Storage. *J Agric Food Chem*, 52(8), 2147-2153.
- Herrero, A. M., Carmona, P., Garcia, M. L., Solas, M. T., & Careche, M. (2005). Ultrastructural changes and structure and mobility of myowater in frozen-stored hake (*Merluccius merluccius* L.) muscle: relationship with functionality and texture. *J Agric Food Chem*, 53(7), 2558-2566.
- Herrero, A. M., Huidobro, A., & Careche, M. (2003). Development of a Quality Index Method for Frozen Hake (*M. capensis* and *M. paradoxus*). *J Food Sci*, 68(3), 1086-1092.
- Hills, B. P. (2006). Applications of Low-Field NMR to Food Science. In G. A. Webb (Ed.), *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, vol. Volume 58 (pp. 177-230): Academic Press.
- Hills, B. P., & Remigereau, B. (1997). NMR studies of changes in subcellular water compartmentation in parenchyma apple tissue during drying and freezing. *International Journal of Food Science and Technology*, 32(1), 51-61.
- Hills, B. P., Takacs, S. F., & Belton, P. S. (1989b). The effects of proteins on the proton N.M.R. transverse relaxation time of water. I. Native bovine serum albumin. *Molecular Physics*, 67(4), 903-918.
- Hills, B. P., Takacs, S. F., & Belton, P. S. (1989c). The effects of proteins on the proton N.M.R. transverse relaxation time of water. II. Protein aggregation. *Molecular Physics*, 67(4), 919-937.

- Hills, B. P., Takacs, S. F., & Belton, P. S. (1990). A new interpretation of proton NMR relaxation time measurements of water in food. *Food Chemistry*, 37(2), 95-111.
- Hills, B. P., Wright, K. M., & Belton, P. S. (1989a). N.M.R. studies of water proton relaxation in Sephadex bead suspensions. *Molecular Physics*, 67(1), 193-208.
- Howgate, P. (1979). Fish. In J. G. Vaughan (Ed.), *Food Microscopy* (pp. 343-392). London, U.K.: Academic Press Inc.
- Huff-Lonergan, E., & Lonergan, S. M. (2005). Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Science*, 71(1), 194-204.
- Hullberg, A., & Bertram, H. C. (2005). Relationships between sensory perception and water distribution determined by low-field NMR T₂ relaxation in processed pork – impact of tumbling and RN– allele. *Meat Science*, 69(4), 709-720.
- Jensen, K. N., Guldager, H. S., & Jørgensen, B. M. (2002). Three-Way Modelling of NMR Relaxation Profiles from Thawed Cod Muscle. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 11(3-4), 201-214.
- Jensen, H. S., & Jørgensen, B. M. (1997). A sensometric approach to cod-quality measurement. *Food Quality and Preference*, 8(5–6), 403-407.
- Jepsen, S. M., Pedersen, H. T., & Engelsen, S. B. (1999). Application of chemometrics to low-field ¹H NMR relaxation data of intact fish flesh. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(13), 1793-1802.
- Jorgensen, B. M., Oehelenschlaeger, J., Olafsdottir, G., Tryggvadottir, S. V., Careche, M., Heia, K., Nesvadba, P., Nunes, M. L., Poli, B. M., Natale, C. D., Pérez-Villareal, B., Ballo, H., Luten, J. B., Smelt, A. J., Denton, W., Bossier, P., Hattula, T., & Akesson, G. (2003). A study of the attitudes of the European fish sector towards quality monitoring and labelling. In J. B. Luten (Ed.), *Quality of Fish from Catch to Consumer*, (p.p. 57-74). Wageningen: Wageningen Academic Publishers.
- Kent, M., & Daschner, F. (2005). Basis of the new method (dielectric time domain reflectometry TDR). In *SEQUID: A New Method for Measurement of the Quality of Seafood* (pp. 19-37). Aachen, Germany: Shaker Verlag.
- Kent, M., Knöchel, R., Daschner, F., Schimmer, O., Tejada, M., Huidobro, A., Nunes, L., Batista, I., & Martins, A. (2005). Determination of the quality of frozen hake using its microwave dielectric properties. *International Journal of Food Science & Technology*, 40(1), 55-65.

- Kong, F., Tang, J., Rasco, B., & Crapo, C. (2007). Kinetics of salmon quality changes during thermal processing. *Journal of Food Engineering*, 83(4), 510-520.
- Kramer, A., Burkardt, G. J., Rogers, H. P. (1951). The shear press, a device for measuring food quality. *Canner*, 112, 34-36.
- Labuza, T. P. (1984). Application of chemical-kinetics to deterioration of foods. *Journal of Chemical Education*, 61(4), 348-358.
- Lambelet, P., Renevey, F., Kaabi, C., & Raemy, A. (1995). Low-Field Nuclear Magnetic Resonance Relaxation Study of Stored or Processed Cod. *J Agric Food Chem*, 43(6), 1462-1466.
- Lambert, J. B., & Mazzola, E. (2004). *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. An Introduction to Principles, Applications, and Experimental Methods*. United States of America: Pearson Education, Inc.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M. (1995). A. L. Lehninger, D. L. Nelson & M. M. Cox (Eds.), *Principios de bioquímica*. Barcelona (España): Omega, S.A.
- Leroi, F. (2010). Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. *Food Microbiol*, 27(6), 698-709.
- Levitt, M. H. (2008). *Spin Dynamics: basics of nuclear magnetic resonance*. West Sussex, England: John Wiley & sons Ltd.
- Licciardello, J.J., Ravesi, E.M., Lundstrom, R.C., Wilhelm, K.A., Correia, F.F., (1982). Time-temperature tolerance and physical-chemical quality tests for frozen red hake. *Journal of Food Quality* 5, 215–234
- Løje, H., Green-Petersen, D., Nielsen, J., Jørgensen, B. M., & Jensen, K. N. (2007). Water distribution in smoked salmon. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(2), 212-217.
- Lloris, D., Matallanas, J., & Oliver, P. (2003). FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Merluzas del mundo (Familia merlucciidae). Catálogo comentado e ilustrado de las merluzas conocidas. In *FAO Catálogo de Especies para los Fines de la Pesca N°2*). Roma.
- Love, R. M. (1970). *The chemical biology of fishes*. Editorial Academic Press. London.
- Lowry R & Tinsley I, (1976) Rapid colorimetric determination of free fatty acids. *J Am Oil Chem Soc* (53), 470-472 .

- MAGRAMA. (2015). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Informe del consumo de alimentación en España.. Disponible en:
http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/informeconsumoalimentación2014_tcm7-382148.pdf
- MAGRAMA. (2014). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. El mercado de la merluza. Disponible en:
http://www.magrama.gob.es/es/pesca/temas/mercados-economia-pesquera/10_INFORME_MERLUZA_FEBRERO_2014_tcm7-336344.pdf
- MARM. (2011). Ministerios de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Estudio de la cadena de valor y formación de precios de la merluza europea. Disponible en:
http://www.magrama.gob.es/gl/estadistica/temas/estadisticas-alimentacion/Estudio_Merluza_tcm10-182788.pdf
- Martín, V.J. (2015). Distribución y consumo de productos pesqueros. Evolución en la demanda y cambios en la cadena comercial. *Distribución y consumo*. Vol-3, 22-32. Disponible en:
http://www.mercasa.es/files/multimedios/1437669993_Distribucion_y_consumo_de_productos_pesqueros.pdf
- Martinez, I. (1997). Muscle physiology and *post-mortem* events. In G. Olafsdottir, J. Luten, P. Dalgaard, M. Careche, V. Verrez-Bagnis, E. Martinsdottir, K. Heia, (Eds.), *Evaluation of fish freshness*. (pp. 204-212). Nantes (Francia): Final Meeting of the Concerted Action.
- Martinez, I., & Jakobsen Friis, T. (2004). Application of proteome analysis to seafood authentication. *Proteomics*, 4(2), 347-354.
- Martins, R. C., Silva, C. L. M. (2003). Kinetics of Frozen Stored Green Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Quality Changes: Texture, Vitamin C, Reducing Sugars, and Starch. *J Food Sci*, 68(7), 2232-2237.
- Martinsdóttir, E., Schelvis, R., Hylding, G., & Sveinsdottir, K. (2009). Sensory evaluation of seafood: methods. In *Fishery Products Quality, safety and authenticity*. In J. Ochenschlager & H. Rebbein (Eds.), *Fishery Products: Quality, Safety and Authenticity* (pp. 338-410). United Kingdom: Blackwell Publishing.
- Meiboom, S., & Gill, D. (1958). Modified Spin-Echo Method for Measuring Nuclear

- Relaxation Times. *Review of Scientific Instruments*, 29(8), 688-691.
- Micklander, E., Peshlov, B., Purslow, P. P., & Engelsen, S. B. (2002). NMR-cooking: monitoring the changes in meat during cooking by low-field ^1H -NMR. *Trends in Food Science & Technology*, 13(9–10), 341-346.
- Mortensen, M., Andersen, H. J., Engelsen, S. B., & Bertram, H. C. (2006). Effect of freezing temperature, thawing and cooking rate on water distribution in two pork qualities. *Meat Science*, 72(1), 34-42.
- Murray, J., & Burt, J. R. (2001). *The composition of fish*. Torry, Scotland, U.K.: Ministry of Technology.
- Navigato, T., Masci, M., Orban, E., Di Lena, G., Casini, I., & Caproni, R. (2012). Analysis of Fatty Acids in 12 Mediterranean Fish Species: Advantages and Limitations of a New GC-FID/GC-MS Based Technique. *Lipids*, 47(7), 741-753.
- Offer, G., & Knight, P. (1988). The structural basis of water-holding in meat part 2: drip losses. In R. Lawrie (Ed.), *Developments in meat science* vol. 4 (pp. 73-243). London: Elsevier Applied Science.
- Olafsdottir, G., Nesvadba, P., Di Natale, C., Careche, M., Oehlenschläger, J., Tryggvadóttir, S.V., Schubring, R., Kroeger, M., Heia, K., Esaiassen, M., Macagnano & A., Jørgensen, B.M., (2004). Multisensor for fish quality determination. *Trends in Food Science and Technology* 15, 86–93.
- Özogul, Y., Özogul, F., Çiçek, E., Polat, A., & Kuley, E. (2009). Fat content and fatty acid compositions of 34 marine water fish species from the Mediterranean Sea. *International journal of food sciences and nutrition*, 60(6), 464-475.
- Paniagua, R., Nistal, M., Sesma, P., Álvarez-Uría, M., Fraile, B., Anadón, R., Sáez, F. J., & de Miguel, M. P. (1998). Tejido Muscular. In R. Paniagua (ed.), *Citología e Histología Vegetal y Animal (Biología de las células y tejidos animales y vegetales)*, (pp. 550-604). Aravaca (Madrid): McGraw-Hill - Interamericana de España, S.A.U.
- Pearce, K. L., Rosenvold, K., Andersen, H. J., & Hopkins, D. L. (2011). Water distribution and mobility in meat during the conversion of muscle to meat and ageing and the impacts on fresh meat quality attributes - A review. *Meat Science*, 89(2), 111-124.
- Peleg, M., Engel, R., Gonzalez-Martinez, C., & Corradini M.G. (2002). Non-Arrhenius and non-WLF kinetics in food systems. *Journal of the Science of Food and*

- Agriculture*, 82 1346–1355.
- Pink, J., Naczek, M., & Pink, D. (1998). Evaluation of the Quality of Frozen Minced Red Hake: Use of Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *J Agric Food Chem*, 46(9), 3667-3672.
- Pink, J., Naczek, M., & Pink, D. (2001). The suitability of Fourier transform infrared methodology for the prediction of dimethylamine content in frozen minced hake. In A. M. Spanier, F. Shahidi, T. H. Parliment, C. Mussinan, C. T. Ho & E. T. Contis (Eds.), *Food Flavors and Chemistry: Advances of the New Millennium*, (pp. 424-432): The Royal Society of Chemistry.
- Provencher, S. W. (1982a). A constrained regularization method for inverting data represented by linear algebraic or integral equations. *Computer Physics Communications*, 27(3), 213-227.
- Provencher, S. W. (1982b). CONTIN: A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations. *Computer Physics Communications*, 27(3), 229-242.
- Puolanne, E., & Halonen, M. (2010). Theoretical aspects of water-holding in meat. *Meat Science*, 86(1), 151-165.
- Purcell, E. M., Torrey, H., & Pound, R. V. (1946). Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid. *Physical Review*, 69(1-2), 37.
- Renou, J. P., Foucat, L., & Bonny, J. M. (2003). Magnetic resonance imaging studies of water interactions in meat. *Food Chemistry*, 82(1), 35-39.
- Rius-Diaz, F., Wärnberg, J. (2014). *Bioestadística*. Madrid (España): Paraninfo S.A..
- Schmidt, S. J. (2007). Water mobility in foods. In G. C. Barbosa-Canovas (Ed.), *Water activity in foods: Fundamentals and applications*, (pp. 47-108). Iowa, USA: Blackwell publishing professional.
- Ros, G., Martinez, C., & Santaella, M. (2010). Pescados y Mariscos. In A. Gil (ed.), *Tratado de Nutrición: Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos* vol. II, (pp. 57-73). Madrid (España): Médica Panamericana S.A.
- Sánchez-Alonso, I., Barroso, M., & Careche, M. (2010). Instrumental texture. In N. M. L. Nolle & M. Toldrá (Eds.), *Handbook of seafood and seafood products analysis* (pp. 425–438). Boca Raton, FL. USA: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Sánchez-Alonso, I., Careche, M., Moreno, P., González, M. J., & Medina, I. (2011). Testing caffeic acid as a natural antioxidant in functional fish-fibre restructured

- products. *LWT - Food Science and Technology*, 44(4), 1149-1155.
- Sánchez-Alonso, I., Carmona, P., & Careche, M. (2012). Vibrational spectroscopic analysis of hake (*Merluccius merluccius* L.) lipids during frozen storage. *Food Chemistry*, 132(1), 160-167.
- Sánchez-Alonso, I., Moreno, P., & Careche, M. (2014). Low field nuclear magnetic resonance (LF-NMR) relaxometry in hake (*Merluccius merluccius*, L.) muscle after different freezing and storage conditions. *Food Chemistry*, 153(0), 250-257.
- Schubring, R. (2004). Instrumental colour, texture, water holding and DSC measurements on frozen cod fillets (*Gadus morhua*) during long term storage at different temperatures. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 100(7), 247-254.
- Shenouda, S. Y. K. (1980). Theories of Protein Denaturation During Frozen Storage of Fish Flesh. In E. M. M. C.O. Chichesters & G. F. Stewart (Eds.), *Advances in Food Research*, vol. Volume 26 (pp. 275-311): Academic Press.
- Silverthorn, D. U. (2007). Músculos. In D. U. Silverthorn (Ed.), *Fisiología humana un enfoque integrado*. (pp. 396-423). Madrid (España): Médica Panamericana S.A.
- Sotelo, C. G., & Rehbein, H. (2000). TMAO-Degrading Enzymes. In Norman F. Haard & B. K. Simpson (Eds.), *Seafood Enzymes: Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality*, (pp. 167-190). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Stansby, M. E. (1962). Proximate composition of fish. In E. Heen & R. Kreuzer (Eds.), *Fish in nutrition*, (pp. 55-60).
- Steen, C., & Lambelet, P. (1997). Texture changes in frozen cod mince measured by low-field nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75(2), 268-272.
- Straadt, I. K., Rasmussen, M., Andersen, H. J., & Bertram, H. C. (2007). Aging-induced changes in microstructure and water distribution in fresh and cooked pork in relation to water-holding capacity and cooking loss – A combined confocal laser scanning microscopy (CLSM) and low-field nuclear magnetic resonance relaxation study. *Meat Science*, 75(4), 687-695.
- Suzuki, T. (1987). Características del músculo de pescado y de las proteínas de pescado. In *Tecnología de las proteínas del pescado y krill*. Zaragoza (España): Acribia S.A.
- Szczesniak, A.S. (1987). Correlating sensory with instrumental texture measurements an overview of recent developments. *Journal of Texture Studies*, 18, 1-15.

- Taoukis, P. S., Labuza, T. P., & Saguy, I. S. (1997). Kinetics of food deterioration and shelf-life prediction. In K. J. Valentas, E. Rotstein & R. D. Singh (Eds.), *The Handbook of Food Engineering Practice* (pp. 2-75). New York: CRC Press.
- Taylor, R. G., Fjaera, S. O., & Skjervold, P. O. (2002). Salmon Fillet Texture is Determined by Myofiber-Myofiber and Myofiber-Myocommata Attachment. *J Food Sci*, 67(6), 2067-2071.
- Tejada, M., Careche, M., Torrejón, P., del Mazo, M. L., Solas, M. T., García, M. L., & Barba, C. (1996). Protein Extracts and Aggregates Forming in Minced Cod (*Gadus morhua*) during Frozen Storage. *J Agric Food Chem*, 44(10), 3308-3314.
- Thaergerabi, R. (2011). Seafood proteins. In G. O. Phillips & P. A. Williams (Eds.), *Handbook of food proteins*, (pp. 116-149). Philadelphia, USA: Woodhead Publishing Limited.
- Tornberg, E., Andersson, A., Goransson A., & von Seth G. (1993). Water and fat distribution in pork in relation to sensory properties In: E. Puolanne, D.I. Demeyer, M. Ruusunen, S. Ellis (eds), *Pork Quality: Genetic and Metabolic Factors*. CAB International, Wallingford, UK.
- Torrejón, P. (1996). *Agregación de proteínas de músculo de pescado congelado. Acción del formaldehído*. PhD. Universidad Complutense. Madrid (España).
- Tsironi, T., Dermesonlouoglou, E., Giannakourou, M., & Taoukis, P. (2009). Shelf life modelling of frozen shrimp at variable temperature conditions. *LWT - Food Science and Technology*, 42(2), 664-671.
- Van Boekel, M. A. J. S. (2008). Kinetic Modeling of Food Quality: A Critical Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7(1), 144-158.
- Van Duynhoven, J., Voda, A., Witek, M., & Van As, H. (2010). Chapter 3 - Time-Domain NMR Applied to Food Products. In A. W. Graham (Ed.), *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, vol. Volume 69 (pp. 145-197): Academic Press.
- Veliyulin, E., Aursand, I. G., & Erikson, U. (2005). Study of Fat and Water in Atlantic Salmon Muscle (*Salmo Salar*) by Low-Field NMR and MRI. In *Magnetic Resonance in Food Science*, (pp. 148-155): The Royal Society of Chemistry.
- Wider, G. (1998). Technical aspects of NMR Spectroscopy with biological macromolecules and studies of hydration in solution. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 32(3), 193-275.
- Wright, N. T. (2003). On a relationship between the Arrhenius parameters from thermal

- damage studies. *Journal of Biomechanical Engineering-Transactions of the Asme*, 125(2), 300-304.
- Wu, H., Wang, Z., Luo, Y., Hong, H., & Shen, H. (2014). Quality Changes and Establishment of Predictive Models for Bighead Carp (*Aristichthys nobilis*) Fillets During Frozen Storage. *Food and Bioprocess Technology*, 7(12), 3381-3389.
- Yano, S., Tanaka, M., Suzuki, N., & Kanzaki, Y. (2002). Texture Change of Beef and Salmon Meats Caused by Refrigeration and Use of Pulse NMR as an Index of Taste. *Food Science and Technology Research*, 8(2), 137-143.
- Zhang, L., Li, X., Lu, W., Shen, H., & Luo, Y. (2011). Quality predictive models of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) at different temperatures during storage. *Food Control*, 22(8), 1197-1202.

7.- ANEXO

1. Publicación: Sánchez-Alonso, I., Martínez, I., Sánchez-Valencia, J., & Careche, M. (2012). Estimation of freezing storage time and quality changes in hake (*Merluccius merluccius*, L.) by low field NMR. *Food Chemistry*, 135(3), 1626-1634

ABSTRACT

The potential of low field NMR (LF NMR) as a fast monitoring technique to estimate the quality of hake (*Merluccius merluccius*) frozen stored at -10°C for up to six months was evaluated. LF NMR clearly detected three populations of water: water strongly bound to macromolecules (T_{2b}), trapped water (T_{21}) and free water (T_{22}). As storage time increased, and concomitant with an increase in the T_{22} and a decrease in the T_{21} water populations, the water holding capacity (WHC) and apparent viscosity values decreased and the shear strength increased, reflecting the characteristic loss of juiciness and tougher texture developed by hake during frozen storage. Two mathematical models were constructed: a simple regression using the biexponential analysis of the relaxation times (T_{21} , T_{22}) and amplitudes (A_{21} , A_{22}) and a partial least square regression (PLS) of CONTIN analysis of the same parameters. Both models seemed suitable to estimate the quality of the product.

2. Publicación: Sánchez-Valencia, J., Sánchez-Alonso, I., Martínez, I., & Careche, M. (2014). Estimation of frozen storage time or temperature by kinetic modeling of the Kramer shear resistance and water holding capacity (WHC) of hake (*Merluccius merluccius*, L.) muscle. *Journal of Food Engineering* 120, 37–43.

ABSTRACT

The present work addresses the kinetic modeling of Kramer shear resistance and water holding capacity (WHC), two relevant quality parameters known to vary with frozen storage time and temperature in hake (*Merluccius merluccius*) muscle. Fillets from 190 hake were stored frozen at -10 °C, -20 °C, -30 °C, and -80 °C for up to 23, 104, 147, and 150 weeks respectively. Kramer shear resistance was adjusted to zero-order kinetics, whereas WHC was in addition fitted to a first order and to a fractional conversion model. The temperature dependence of (i) the rate of WHC loss and (ii) the instrumental shear resistance increase during frozen storage, both followed an Arrhenius type pattern. A good agreement was found between predicted and observed values for both of them, which indicated their potential usefulness for quality management and the estimation of remaining shelf life.

3. Publicación: Sánchez-Valencia, J., Sánchez-Alonso, I., Martínez, I., & Careche, M. (2015). Low-Field Nuclear Magnetic Resonance of Proton (^1H LF NMR) Relaxometry for Monitoring the Time and Temperature History of Frozen Hake (*Merluccius merluccius* L.) Muscle. *Food and Bioprocess Technology*, 8(10), 2137-214

ABSTRACT

The objective of the work was to investigate the potential of ^1H LF NMR relaxometry to produce indicators useful in the estimation of the quality and shelf life of frozen hake (*Merluccius merluccius* L.) muscle as affected by storage temperature and time. ^1H Low Field NMR T_2 transverse relaxation measurements were performed from fillets of a total of 145 hakes that had been stored at -10, -20, -30 or -80 °C for up to 150 weeks. The Principal Component (PC) scores from the ^1H LF NMR distribution of T_2 relaxation times were adjusted to zero-order kinetics and the reaction rates followed an Arrhenius type pattern. Kinetic modeling using the PC scores of the 12-400 ms range resulted in the best model corresponding to both T_{21} and T_{22} regions. The temperature dependency of the rate of reactions, measured by B values, was similar to that previously found for shear resistance and for the hydrolysis of phospholipids, well known markers related to the sensory quality in this species. Thus, our results suggest that this methodology has a great potential to evaluate the frozen storage time and temperature in hake as well as to provide an indication of the expected quality of the fillet.

4. Comunicación a congreso: Sánchez-Alonso, I., Martínez I., Sánchez-Valencia J., & Careche, M. Use of low field NMR to Estimate freezing storage time and quality changes in hake (*Merluccius merluccius*, L.) (presentación oral) WEFTA 2011

ABSTRACT

Freezing storage is one of the most efficient means of increasing the shelf life of seafood but it alters the organoleptic properties of the product which becomes tougher and dryer, with lower water holding capacity (WHC), apparent viscosity (AV), extractability and solubility of myofibrillar proteins and increased shear resistance (SR). Current methods to predict frozen storage time of seafood are usually labour intensive and/or destructive. A fast method, with the potential to be used on-line would be highly desirable, and low field nuclear magnetic resonance (LF NMR) seemed a good candidate to fulfill this need because it is non-destructive and non-invasive, it requires only minimal or no sample preparation and offers the possibility to produce characteristic fingerprints for a given sample. The aim of the present work was to establish whether LF NMR could be used to predict changes in the quality of frozen stored hake and/or estimate its shelf life.

Hake fillets stored at -10 °C (temperature selected to shorten the experimental period) were regularly sampled for up to 21 weeks and WHC, AV, SR and T_2 relaxation measurements (LF NMR analyzer minispec mq 20) were measured. LF NMR clearly detected three populations of water: water strongly bound to macromolecules (T_{2b}), trapped water (T_{21}) and free water (T_{22}). As storage time increased, and concomitant with an increase in the T_{22} and a decrease in the T_{21} water populations, the WHC and AV decreased and the SR increased, reflecting the characteristic loss of juiciness and tougher texture developed by hake during frozen storage. Two mathematical models were constructed: a simple regression using the biexponential analysis of the relaxation times (T_{21} , T_{22}) and amplitudes (A_{21} , A_{22}) and a partial least square regression (PLS) of CONTIN analysis of the same parameters. Both models seemed suitable to estimate the quality of the product.

5. Comunicación a congreso: Careche, M., Sánchez-Valencia, J., Sánchez-Alonso, I. & Martinez, I. Kinetic Modeling of Kramer Shear Resistance and Water Holding Capacity of Frozen Stored Hake (*Merluccius merluccius*, L.) Muscle. (presentación oral) TAFT 2012

ABSTRACT

The analytical methods developed to authenticate seafoods usually address the verification of the species, geographic origin and production method, but there is a lack of methods to authenticate its processing and to estimate the shelf life of frozen fish products. Yet, this is necessary not only to comply with the current legislation about labelling but also as a demand from the fish sector.

The Arrhenius equation relates the specific reaction rate (k) with the absolute temperature (T) so that if a given physical change or chemical reaction follow an Arrhenius type behavior, the measurement of this process can provide an estimation of the storage time if the temperature is known and *viceversa*. It has been successfully used to correlate the temperature dependence of the rate of the reactions of many biological materials including food systems. Given that WHC and Kramer shear resistance are both important parameters to evaluate the quality of frozen stored lean species and that they are easy to perform in a quality control laboratory, the aim of the present work was to establish whether the temperature dependence of these two parameters followed an Arrhenius type pattern during frozen storage of hake (*Merluccius merluccius* L.) muscle and if so, to determine whether they could be used to estimate quality changes in terms of time-temperature history.

For each of the three storage temperatures examined (-10 -20 and -30 °C), Kramer shear resistance was adjusted to zero-order kinetics, whereas WHC was fitted to a logarithmic function. The time and temperature dependence of both parameters was modeled in one-step by using nonlinear regression. A good agreement was found between predicted and observed values for both of them, which allowed good physical interpretation of parameter estimates and indicated their potential usefulness for quality management.

6. Comunicación a congreso: Careche, M., Sánchez-Valencia, J., Sánchez-Alonso, I. & Martinez, I. Modeling Time and Temperature History of Frozen Thawed Hake (*Merluccius merluccius*, L.) muscle by Low Field Nuclear magnetic Resonance spectroscopy (LF NMR). (poster) TAFT 2012

ABSTRACT

Freezing, frozen storage and thawing of fish muscle products induce changes in their water distribution and mobility evidenced by several populations of water detected by the T_2 transversal relaxation times, a parameter easily measured in a non-destructive, non-invasive manner by low field nuclear magnetic resonance (LF NMR). The aim of this work was to explore the potential of LF NMR to authenticate the time and temperature history of frozen thawed fish fillets.

The T_2 relaxation times of hake (*Merluccius merluccius*, L.) fillets stored at -10, -20, and -30 °C for up to 120 weeks were measured using a LF NMR minispec mq 20. Several populations of water were observed including the so called “trapped” water (T_{21}) and “free” water (T_{22}). The relaxation times and the relative abundance of these water pools displayed higher changes the higher the storage time, whose change rate was higher the higher the storage temperature.

Principal Component Analysis of the NMR distribution function obtained by CONTIN analysis, showed that 7 Principal Components (PC) explained 91% of the total variance. Interestingly, the PC1 was found to have an Arrhenius type behavior with a coefficient of determination of 0.91. The Arrhenius equation relates the specific reaction rate (k) with the absolute temperature (T) of many physical and biological systems and is therefore potentially useful to model the time and temperature of frozen thawed samples. The results of the model presented here on LF NMR data were comparable to the results of modeling the water holding capacity, a well-known marker for the sensory quality of fish muscle.

In conclusion, modeling of the results obtained by LF NMR and their close relationship with well-known quality parameters, suggests that this technique has a clear potential to be used for the authentication of frozen storage time and temperature in fishery products.